



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“Expresión del miRNA 372-5p y el miRNA 21-3p en membranas
fetales humanas estimulado por *Escherichia coli*”**

Que para obtener el título de:

Biólogo

P R E S E N T A:

Sandra Lizeth Alvarado Ortigoza

Director de tesis:

M. en C. Héctor Flores Herrera

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. De México.

Octubre, 2021.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Inmunobioquímica del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” (INPer/IER) bajo la dirección del M. en C. Héctor Flores Herrera.

Forma parte del proyecto “La progesterona modula la secreción de las proteínas de choque térmico en el tejido de la coriodesidua después de la estimulación con *Escherichia coli* en un modelo de infección” con el No. de registro: 2017-2-82 y contó con presupuesto federal otorgado a HFH.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México. Por brindarme el honor de formarme académicamente como bióloga, abriéndome las puertas al mundo de la investigación científica. Gracias a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por convertirse en mi segunda casa y permitirme conocer a personas tan maravillosas con pasión y amor por la docencia. Me siento muy orgullosa de pertenecer a esta comunidad.

Al Instituto Nacional de Perinatología por abrirme las puertas de sus laboratorios y permitirme conocer las diferentes áreas donde pueden desarrollarse los biólogos.

Al Mtro. Héctor Flores Herrera por la oportunidad de realizar la tesis de licenciatura bajo su orientación. Gracias Héctor, por confiar en una estudiante de séptimo semestre de la carrera de biología y por siempre procurar mi bienestar. Gracias por tu apoyo a lo largo de este proceso, esta etapa que estoy concluyendo es por ti. Espero tenerte en mi vida mucho tiempo más para que sigas contagiando ese amor por la ciencia.

A mis compañeras de laboratorio. Janelly Jovanna y Mercedes, gracias por ser mi guía en el laboratorio, sin ustedes hubiera incendiado toda la torre de investigación. Mercedes, gracias por permitirme entrar en tu vida y conocer la hermosa persona que eres. Te quiero mucho.

Al Dr. Ismael Hernández Pérez. No tengo palabras para describir lo mucho que hiciste por mí, ni siquiera estoy segura que tú lo hayas hecho, sin embargo, espero que en donde estes sepas que fuiste mi ancla en el momento más oscuro dentro de la carrera, si logre concluir la carrera fue por ti porque no dejaste que me rindiera, porque me enseñaste que, aunque no esté en nuestros planes a veces la vida nos pone donde debemos estar y eso está bien. Gracias por enseñarme que se puede llegar a la meta por caminos distintos. Lamento en lo más profundo de mí que ya no estes físicamente con nosotros y que no puedas ver que lo logre, pero ¡¡LO LOGRE ISMA!

A mis sinodales el Dr. Hugo Perales, Martha Salcedo, Teresa Melo y Erick López, por aceptar ser parte del comité, por su tiempo, observaciones y comentarios, así como su disponibilidad y flexibilidad para lograr finalizar. Ustedes fueron parte clave en este proyecto. Gracias

A los profesores de la FES-I por compartir conmigo su amor por la carrera y hacerme amarla cada día más desde diferentes ramas. Gracias a Sergio Vaca, Llaraí Gaviria, Ismael Hernández, María Eugenia Heres, Ricardo Medina, Sara Rodríguez, Roberto Steyer y Erick Loeza.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme llegar hasta este punto a pesar de los tiempos difíciles que afectan a la humanidad. Gracias por llenarme de tu paz, amor y bondad.

A mis padres Roberto y Guadalupe: Ustedes han sido mi inspiración desde el inicio, no se como agradecerles la vida que me han dado, una vida llena de amor, alegría y unión. Espero algún día Dios me permita regresarles un poquito de todo lo que me han dado.

Papá, gracias infinitas por siempre estar, porque el hecho de saberte conmigo me hace una mujer fuerte, gracias por enseñarme que debo aprender a volar sin miedo. Gracias por tus consejos y por tener en ti un ejemplo de superación y de fortaleza.

Mamá, gracias por siempre creer y confiar en mí, porque en los momentos más estresantes de la carrera ahí estabas tú, recordándome que yo podía y haciéndome ver que aun podía dar un poco más. Gracias porque sin ti, este camino hubiera sido más difícil.

A mis hermanas por ser mis compañeras de vida, gracias por siempre escucharme cuando tenia que gritar, por hacerme olvidar de los problemas con sus bromas, por motivarme a ser una mejor versión de mí. Gracias Gaby por ser mi ejemplo de independencia y fuerza. Gracias Diana por enseñarme que los limites no existen. Gracias Rocío por enseñarme que la perseverancia siempre trae su recompensa y GRACIAS INFINITAS a Dulce por ser mi corazón y mi pedazo de cielo en la tierra. Las amo con el alma. Si las tengo a ustedes lo tengo todo.

A la familia Alvarado por enseñarme que la familia unida siempre puede con todo. Gracias a mi Tía Marcela y a mi tío Antonio, por siempre apoyarnos incondicionalmente y porque a lo largo de este año me ha dado ánimos para finalizar este proyecto y para comenzar uno nuevo. Gracias

A Xiadani Gracias por pasar estos 4 años de carrera conmigo, gracias por ser mi compañera de estudio, pero más que nada gracias por tu amistad tan bonita. Tus letras me alegran el corazón.

A mis amigos. Angel, Lisset. Gracias por no soltarme en estos 8 años y siempre estar cuando los necesito.

“Aquel que tiene un porqué para vivir se puede enfrentar a todos los cómo”

Friedrich Nietzsche

ÍNDICE GENERAL

1.0 INTRODUCCIÓN	13
2.0 ANTECEDENTES	15
2.1 Estructura y función de las membranas fetales en vertebrados	15
2.1.0 Estructura y función de las MFH	16
2.1.1 Desarrollo y estructura del amnios	18
2.1.2 Desarrollo y estructura del corion	21
2.1.3 Función de las MFH	22
2.2 Trabajo de parto.....	24
2.3 Parto pretérmino	25
2.4 Ruptura prematura de las MFH.....	27
2.5 Infecciones intrauterinas	28
2.6 Agentes patógenos	29
2.6.0 <i>Escherichia coli</i> como agente patógeno en IU	32
2.7 Ácido ribonucleico (RNA).....	33
2.7.0 MicroRNAs (miRNAs)	34
2.7.1 Biogénesis de los miRNAs	35
2.7.2 Importancia biológica de los miRNAs	38
2.7.3 Función del miRNA 372-5p	39
2.7.4 Función del miRNA 21-3p	41
3.0 JUSTIFICACIÓN	43
4.0 OBJETIVOS	44
4.1 Objetivo general	44
4.2 Objetivos particulares.....	44
5.0 HIPOTESIS	44
6.0 MATERIALES Y MÉTODOS	45
6.1 Aspectos éticos	45
6.2 Características de las pacientes	45
6.3 Obtención de las MFH	45
6.3.0 Procesamiento de las MFH en el sistema de Transwell.....	46

6.4 <i>Escherichia coli</i>	46
6.4.0 Estimulación de las MFH con <i>E. coli</i>	47
6.5 Extracción de RNA total.....	47
6.5.0 Reacción de RT-PCR	48
6.5.1 Reacción de PCR.....	48
6.5.2 Visualización de las bandas de expresión de los miRNAs 372-5p y 21-3p.....	49
6.6 Análisis estadístico	49
7.0 RESULTADOS	50
7.1 Características de las pacientes	50
7.2 Perfil de expresión del miRNA 372-5p	50
7.3 Perfil de expresión del miRNA 21-3p	55
8.0 DISCUSIÓN	61
9.0 CONCLUSIÓN	64
10.0 REFERENCIAS	65
ANEXO 1	71
ANEXO 2	72

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

MFH	Membranas fetales humanas
TGF-β	Factor de crecimiento tumoral beta
HSP	Proteínas de choque térmico
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
TNF-α	Factor de crecimiento tumoral alfa
IL-8	Interleucina 8
miRNA	microRNA
TLR	Receptores tipo toll
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
MEC	Matriz extracelular rica en colageno
AM	Membrana amniótica
CDH	Tejido de la coriodecidua
SBF	Suero bovino fetal
SASP	Fenotipo secretor asociado a la senescencia
ITU	Infección del tracto urinario
RT	Retro transcripción
PP	Parto prematuro
pPROM	La ruptura prematura de las membranas fetales

ÍNDICE DE FIGURAS

	PAGS
FIGURA 1. Disposición de las membranas fetales en vertebrados.....	16
FIGURA 2. Ubicación anatómica y embriológica de las MFH.....	18
FIGURA 3. Características de las membranas fetales humanas.....	22
FIGURA 4. Número de nacimientos por edad gestacional en el INPer del 2014-2018.....	26
FIGURA 5. Número de recién nacidos pretérmino en el INPer del 2014-2018.....	26
FIGURA 6. Causa de muerte en nacidos pretérmino en el INPer del 2014-2018.....	27
FIGURA 7. Etapas de la infección ascendente en PP.....	29
FIGURA 8. Vía general propuestas de trabajo infeccioso y no infeccioso.....	31
FIGURA 9. Diversidad de RNAs en una célula de mamífero típica.	34
FIGURA 10. Biogénesis y mecanismo de acción más frecuente en animales.....	38
FIGURA 11. Estandarización del miRNA 372-5p.....	50
Figura 12. Perfil de expresión del miR- 372- 5p a 3 horas de estimulación con <i>E. coli</i>	52
Figura 13. Perfil de expresión del miR- 372-5p a 6 horas de estimulación con <i>E. coli</i>	53
Figura 14. Perfil de expresión del miR- 372-5p a 24 horas de estimulación con <i>E. coli</i> ...	54
Figura 15 Estandarización del miRNA 21-3p.....	55
Figura 16. Perfil de expresión del miR-21-3p a 3 horas de estimulación con <i>E. coli</i>	56
Figura 17. Perfil de expresión del miR-21-3p a 6 horas de estimulación con <i>E. coli</i>	58
Figura 18. Perfil de expresión del miR-21-3p a 24 horas de estimulación con <i>E. coli</i>	59

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. <i>Factores secretados por la membrana amniótica en humanos.....</i>	20
TABLA 2. <i>Secuencia de iniciadores específicos para RT.....</i>	48
TABLA 3. <i>Secuencia de iniciadores específicos para PCR.....</i>	49

RESÚMEN

Antecedentes: Las membranas fetales humanas, están conformadas por dos regiones: el epitelio amniótico (AM), que está en contacto directo con el líquido amniótico y el feto, y el tejido de la coriodecidua (CDH) la cual esta en contacto con la cavidad uterina. La CDH es un tejido altamente organizado con una función inmunológica importante. Estudios realizados previamente por nuestro grupo de investigación han demostrado que la respuesta inflamatoria causada por *E. coli* se encuentra mediada por pequeños RNA no codificantes (miRNA). El principal objetivo de esta investigación fue determinar mediante un modelo *in vitro* el perfil de expresión del miR-372-5p y del miR-21-3p al estimular directamente la región de la CDH con *E. coli*, y subsecuentemente se analizó las expresiones en epitelio AM.

Materiales y método. Se estimulo la región de la CDH con *E. coli* a diferentes concentraciones (10^2 , 10^4 , 10^5 , 10^6 UFC/ml) por 3, 6 y 24-horas y se recuperó el medio de cultivo. De cada condición experimental se obtuvo el RNA total a partir de 500 μ L de medio de cultivo al cual se le adicionó 500 μ L del reactivo de TRIzol. El perfil de expresión de los miRNAs se obtuvo mediante la retrotranscripción (RT) y posteriormente se realizó una reacción en cadena de polimerasas (PCR) con iniciadores específicos. Los amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 4%. Se determinó la densidad óptica de las bandas mediante el programa ImageJ. Los datos se analizaron por ANOVA y por la prueba de Tukey y se consideró una diferencia estadística menor a 0.05.

Resultados: Al estimular al tejido de la CDH se observó el aumento en la expresión del miR-372-5p a las 3 horas; sin embargo, no encontramos una diferencia estadísticamente significativamente con respecto al grupo control. A las 6 horas observamos el incremento en la expresión del miR-372-5p con 10^4 y 10^5 UFC/ml de *E. coli*; sin embargo, a las 24 horas observamos la disminución en la expresión del miR-372-5p en todas las concentraciones de *E. coli*. En el epitelio AM observamos el aumento en la expresión del miR 372-5p a las 3, y 6 horas; en tanto que a las 24 horas observamos una disminución en su expresión.

El miR 21-3p observamos a las 3 horas el aumento significativo en su expresión, mientras que a las 6 horas observamos la disminución en su expresión; sin embargo, no es estadísticamente significativa con respecto al grupo control. A las 24 horas observamos el aumento en la expresión del miR-21-3p con 10^6 UFC/mL

de *E. coli*. En el epitelio AM observamos el incremento en la expresión del miR-21-3p a las 3 horas. En tanto que a las 6, y 24 horas observamos una disminución significativa en la expresión del miR-21-3p.

Conclusión: *Escherichia coli* induce de manera diferencial la expresión del miR-372-5p y miR-21-3p en el tejido de la CDH y es dependiente del tiempo, y de las unidades formadoras de *Escherichia coli*. Nuestros resultados demuestran la comunicación entre el tejido de la CDH y el epitelio AM.

1.0 INTRODUCCIÓN

Las membranas fetales humanas (MFH) se forman a partir del trofoblasto; esta es una capa celular externa de blastómeras. Las MFH están compuestas por el tejido de la coriodecidua (CDH) y por el epitelio amniótico (AM) [2]. Las MFH tienen como función la protección, nutrición, respiración, excreción, mantenimiento inmunológico y el desarrollo fetal, así como la producción de hormonas [3, 6, 20] A lo largo del embarazo las MFH se caracterizan por encontrarse en un estado latente [13] promovida por diversos mediadores anti-inflamatorios como la interleucina (IL)-10 [23, 24, 25], el factor de crecimiento tumoral tipo beta (TGF- β), hormonas esteroides (progesterona y estradiol) [18], y por la proteína de choque térmico (Hsp) de 27-KDa [27, 29, 30]. Diversas evidencias sugieren que el inicio del trabajo de parto humano representa un proceso inflamatorio, caracterizado por el aumento de citocinas de tipo: IL-1 β , IL-6, IL-8 y factor de necrosis tumoral (TNF- α) [21, 22,26], las cuales en su conjunto están regulando tanto la contractibilidad del miometrio, adelgazamiento del cuello uterino, así como la ruptura de las membranas fetales durante el parto a término [31].

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa y ha sido relacionada a infecciones del tracto urinario (ITU), y a los nacimientos prematuros siendo un problema de salud pública mundial, ya que la prematures en el embarazo es una causa directa de al menos el 70% de los casos de muertes neonatales [47, 48, 49]. En el embarazo la presencia de *E. coli* compromete el desarrollo a término del embarazo, ya que los microorganismos y sus componentes estructurales son reconocidos por receptores específicos tales como los receptores de tipo toll (TLR) que inducen la producción de quimiocinas (por ejemplo, IL-8, IL-1, CCL-2), citoquinas (IL- β , TNF- α), prostaglandinas y proteasas que conducen a la activación de la vía común del parto lo que representa un proceso inflamatorio [34, 46].

Recientemente, se ha demostrado que este balance anti/pro inflamatorio en el embarazo está regulado por una clase de pequeños RNA no codificantes denominados miRNAs, cuyo producto maduro tienen una longitud de 22 nucleótidos [32]. Los miRNAs regulan la expresión génica pos-transcripcional por apareamiento imperfecto a sus RNA mensajeros blanco (mRNA), generalmente en la región 3'-no traducible, bloqueando la síntesis de proteínas por desestabilización del mRNA y represión traduccional [33].

Diversos estudios han demostrado que la respuesta inflamatoria se encuentra mediada por diversos miRNAs. Sin embargo, aún no se ha estudiado la participación del miRNA 372-3p y *del* miRNA21-5p en tejido de la coriodecidua durante el proceso infeccioso.

2.0 ANTECEDENTES

2.1 Estructura y función de las MF en vertebrados.

Todos los vertebrados poseen tejidos de un origen extraembrionario que en algunos casos son conocidos como membranas fetales (MF). Las MF cumplen con diversas funciones a lo largo del embarazo como la respiración embrionaria, nutrición, protección y excreción [1,2]; sin embargo, estas funciones cambian hacia el trabajo de parto.

El desarrollo de las MF está regido por el modo de implantación del cigoto y esto repercute en la formación embrionaria entre especies, dándoles diferentes propiedades como son la forma, tamaño, composición, así como la síntesis de tejidos extraembrionarios que puede o no tener la especie [2].

A lo largo del tiempo, las MF han ido evolucionando, dando como resultado una amplia variedad de tipos de estructuras; en la figura 1 se puede observar las diferencias en cuanto a la ausencia o presencia de ciertos tejidos extraembrionarios. En el caso de las amniotas como son las aves, tortugas y cocodrilos ocurre la fusión de dos membranas extraembrionarias, que finalmente forman la membrana corioalantoidea.

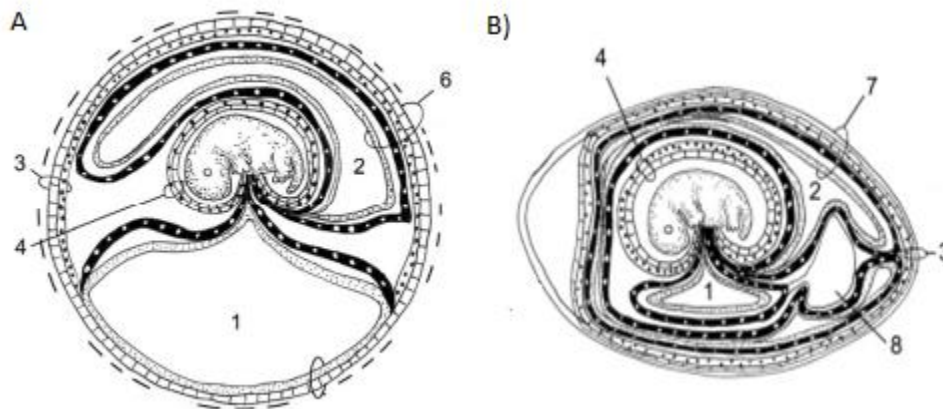


Figura 1. Disposición de las membranas fetales en vertebrados. A) Aves, B) Reptiles escamosos. 1. Saco vitelino; 2. Alantoides; 3. Corion; 4. Amnios; 5. Placenta coriovitelina; 6 placenta corioalantoidea; 7. Membrana corioalantoidea; 8. Albúmina. Tomado y modificado de Ferner 2011.

2.1.0 Estructura y función de las MFH

Después del miometrio, se encuentra la placenta, donde se alojan las membranas fetales humanas (MFH, Fig. 2A). Las MFH, se componen de una yuxtaposición de tres capas germinales primarias: el amnios y el corion de origen fetal y la decidua de origen materno [3]. Estas capas nunca son inervadas y solo existen como tejidos embrionicos accesorios, se caracterizan por ser genéticamente idénticas al feto, sin embargo, su tiempo de vida se limita al trabajo de parto [5].

Durante el embarazo existe la necesidad de que las MFH adquieran una propiedad biomecánica ajustable al crecimiento y movimientos del feto dentro de un bípedo erguido. A diferencia de otros vertebrados la postura erguida del humano conlleva una dificultad mayor para las MFH, lo que hace que estas adquieran características y propiedades diferentes, [6] por ejemplo, estas deben ser lo suficientemente fuertes y elásticas para soportar un estiramiento del doble de su tamaño al momento del

término del embarazo y simultáneamente resistir los movimientos fetales vigorosos [4, 7].

Como ya se ha mencionado, las MFH se conforman de tres capas, el amnios, el corion y la decidua. La formación de las primeras 2 capas (amnios y corión) comienza con la embriogénesis. Tanto el amnios como el corion poseen subcapas que logran una conexión entre ambos mediante una región de matriz extracelular rica en colágeno (MEC) formando el "amniocorión" (Fig. 2B) [8, 9]. El MEC, está compuesta de proteínas fibrosas incrustadas en un gel de polisacárido junto con varios tipos de colágeno, forma el marco arquitectónico y varios tipos de colágeno proporcionan el marco estructural de las membranas fetales [10, 11]. El amniocorión rodea y recubre la cavidad intrauterina. La formación de amniocorión como estructura de unidad se completa entre las semanas 13 y 15 de gestación. El crecimiento y el desarrollo de amniocorión se correlacionan con el crecimiento fetal con una longevidad de 40 semanas [12, 13].

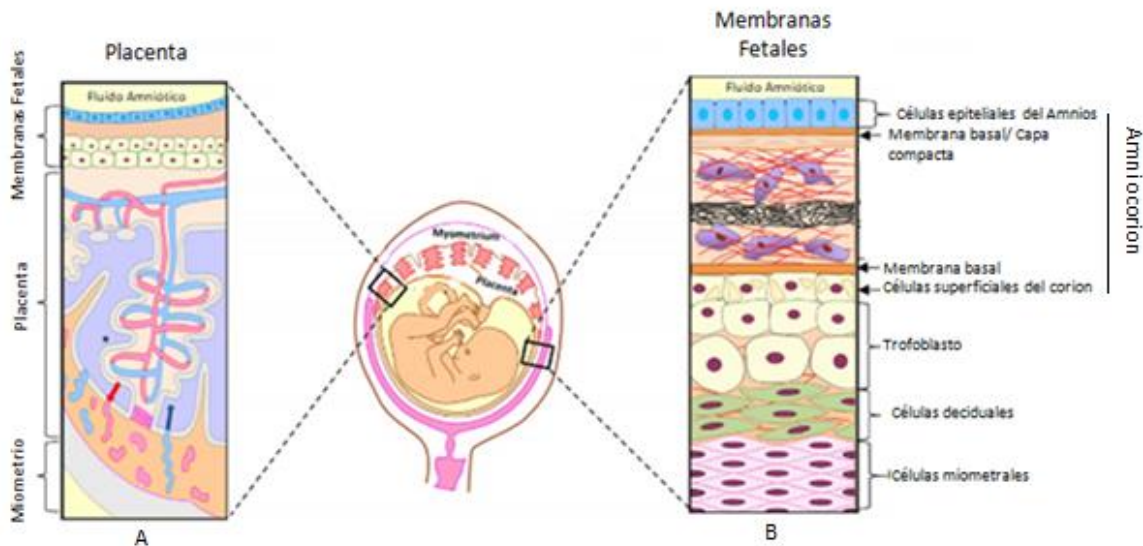


Figura 2. Ubicación anatómica y embriológica de las MFH; A) ubicación anatómica B) Estructura de las MFH; Las células epiteliales del amnios están conectadas a la primera capa de la ECM llamada la membrana basal/capa compacta. La capa fibrosa, esponjosa y capas reticulares le proceden las cuales contienen células del estroma (células moradas). El corion se conecta al ECM a través de una membrana pseudo-basal. El corion se compone de dos tipos de células: (1) Células superficiales del corion que contienen vacuolas (círculos amarillos oscuros) y (2) las células de trofoblastos de corion. El corion interactúa con la decidua, comunicando al feto con los compartimentos maternos del útero. Imagen tomada de Martín (2018) con modificaciones por Olvera (2019)

2.1.1 Desarrollo y estructura de amnios

Durante el desarrollo del embrión, la masa celular se diferencia en dos capas, el hipoblasto y el epiblasto. Del epiblasto se van a derivar los amnioblastos que se van a diferenciar en células amnióticas epiteliales, mientras que la capa mesenquimatosa extraembrionaria se va a especializar en tejido conectivo amniótico [14, 15]. Las células amnióticas son responsables de la síntesis, degradación y recambio de la MEC. La matriz extracelular en cambio es la

responsable de dar soporte a las células amnióticas, esto gracias a sus componentes estructurales como el colágeno. La mayor fuerza tensil es provista por los colágenos intersticiales, tipo I y III, junto con pequeñas cantidades de los tipos V, VI y VII en la capa compacta sobre la membrana amniótica basal del amnios [5, 10]. Sin embargo, este arreglo de los colágenos de la capa compacta y de la membrana amniótica basal da fuerza extra a los tejidos expuestos a las fuerzas mecánicas, necesario cuando las membranas son estiradas en el embarazo a término [8, 9]. Esta membrana es notablemente fuerte y elástica, lo que hace que el amnios sea resistente al alargamiento progresivo del embrión en crecimiento, los traumas internos y externos y los cambios repentinos de presión [16, 17]. El amnios está constantemente bañado en líquido amniótico, lo que significa su importancia como regulador primario a los cambios en la cavidad amniótica [18].

La membrana amniótica es una fuente de varios factores biológicamente activos involucrados en la regeneración y remodelación de tejidos [13] (Tabla 1). Los factores de crecimiento promueven la proliferación, la migración, la diferenciación y la re-epitelización durante la gestación. Específicamente, el factor de crecimiento epidérmico y de queratinocitos estimulan la proliferación y migración de las células epiteliales, desempeñando un papel importante en la remodelación de tejidos, esto debido a que la distensión mecánica puede resultar en cambios de la respuesta autocrina-paracrina y en distorsión de la matriz extracelular, esto puede afectar el sistema autocrino paracrino [19, 20]. El sistema autocrino paracrino puede determinar la pérdida y formación de contactos célula-matriz entre los receptores de integrinas celulares, fibronectinas, lamininas y el control de la inducción y activación de las MMPs degradativas. Los reguladores autocrino-paracrino involucrados incluyen hormonas, citocinas, factores de crecimiento, y la matriz extracelular y sus fragmentos. [13] El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) regula la proliferación, migración y diferenciación celular, así como la remodelación de la

matriz extracelular [20], se ha de mostrado que el TGF- β inhibe la degradación de ECM al aumentar la producción de colágeno, suprimiendo la expresión de metaloproteinasas y estimulando sus inhibidores de tejido [21]. Es crítico que estos procesos permanezcan en la homeostasis durante la gestación para gestionar la distensión uterina y el estiramiento de las membranas fetales a causa del crecimiento fetal y el aumento de volumen [5, 19].

Tipo de tejido	Categorías	Nombre específico	Referencia
Membrana amniótica	Regeneración y remodelación de tejidos	Factor de crecimiento epidérmico (EFG) Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) Factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) Factor de crecimiento transformante Alfa y Beta (TGF-A/B) Angiotensina Interleucina 8	
	Cicatrizantes	Factor de crecimiento transformante Beta Factor de crecimiento de hepatocitos Interleucina 10	TGF-B HGF IL-10
	Antibacteriano	Defensinas catelicidina	
	Antimicrobiano	ElafIn inhibidor de la proteasa leucocitaria secretora	SKALP SLPI
	Anti inflamatorio	Interleucina 10 Antagonista del receptor de interleucina 1 Prostaglandina E2	IL-10 IL1 RA PGE2

Tabla 1 Factores secretados por la membrana amniótica en humanos

2.1.2 Desarrollo y estructura del corion

La formación del corion comienza el día 14, cuando las células mesenquimales, derivadas del disco embrionario, se extienden por debajo de la superficie interna de la capa de citotrofoblasto del implanta blastocisto y forma el saco coriónico [8]. El corion consta de dos capas: una externa formada por el trofoblasto y una interior formado por el mesodermo somático (Figura 3).

La capa externa (trofoblasto) está formado por una capa de células cúbicas denominadas citotrofoblasto y una capa externa de protoplasma, el sincitiotrofoblasto (Figura 1). El corion se compone de múltiples capas de células de citotrofoblasto y un estroma que se fusiona con el amnios en la membrana fetal madura. Estas células contienen marcadores de células madre, un grupo de diferenciación (CD) CD34 y CD45. La membrana coriónica también contiene más factores de crecimiento y más citoquinas en comparación con la membrana amniótica. El corion muestra niveles más altos de adiponectina, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento endotelial vascular derivado de la glándula endocrina, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, AA y -BB, inhibidor de tejidos de metaloproteinasa -2 y -4, que refuerza el potencial hematopoyético del corion [8, 16]. La secreción de estos factores logra un efecto antibacteriano más fuerte que el amnios, lo que refuerza la importancia del tejido de la coriodescuidia (CDH) ya que esta permite la tolerancia materno-fetal, así como la protección del feto contra posibles infecciones.

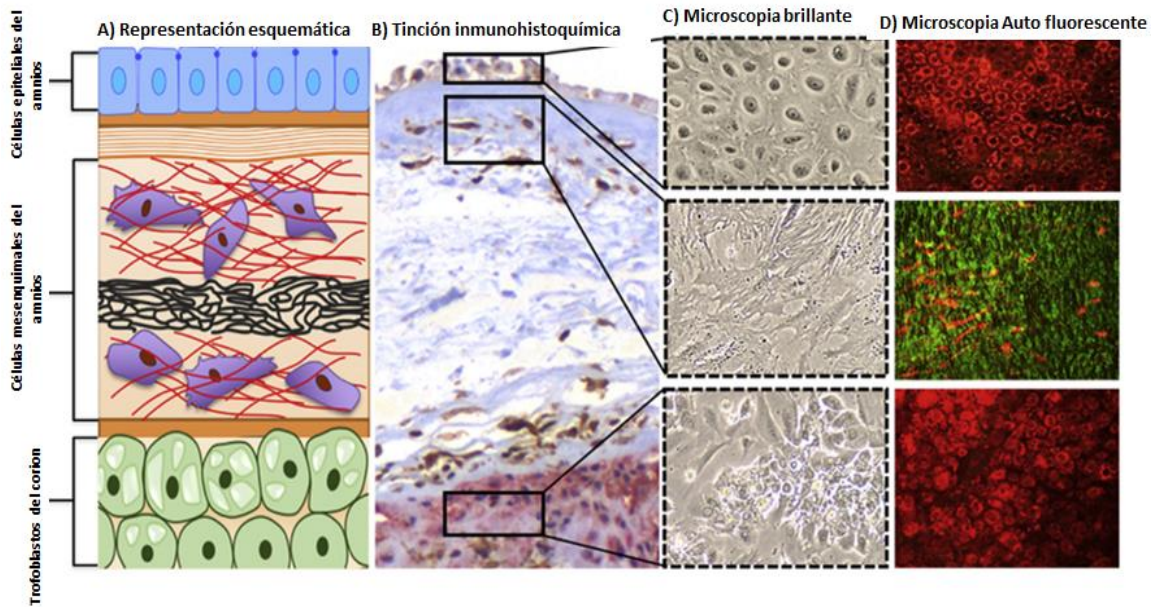


Figura 3. Características de la membrana fetal. A) Representación esquemática de las membranas fetales. La descripción comienza desde la capa más interna (amnios) y termina en la capa inicial de corion. Las células epiteliales de amnios (azul) están conectadas a la primera capa de la matriz extracelular denominada membrana basal (naranja) / capa compacta (tiras anaranjadas). Siguen las capas de fibroblastos (rojo superior), esponjosas (negro) y reticulares (rojo inferior), que contienen células mesenquimatosas y estromales de amnios (púrpura). El corion (verde) está conectado a la matriz extracelular a través de una membrana pseudo-basal (naranja). El corion está formado por dos tipos de células: (1) el corion deja células que contienen vacuolas (verde claro) y (2) las células del trofoblasto de corion. El corion interactúa con la decidua materna, conectando los compartimentos fetales con los maternos del útero. B) Tinción inmunohistoquímica de membranas fetales para comparación de capas celulares y de colágeno. C) Microscopía de vuelo brillante de células primarias de membrana fetal humana que revela la morfología en cultivo. Las células epiteliales de amnios y coriones expresan la morfología epitelial cuboidal, mientras que las células mesenquimatosas de amnios en la matriz extracelular demostraron una forma fibroblastoide alargada con la presencia de filamentos de actina. Las imágenes fueron capturadas a 10x y recortadas. D) La microscopía autofluorescente multiphoton y la microscopía de segunda generación armónica de imágenes simples confirman la morfología celular y del colágeno. Componentes celulares: rojo, colágeno, verde. Las imágenes fueron capturadas a 25x y recortadas. Imagen tomada de Menon (16).

2.1.3 Función de las MFH

El amnios y el corion, funcionan como una sola unidad y pueden ser conceptualizados como una estructura unificada, esta mantiene su propio equilibrio homeostático. Las MFH desempeñan un papel importante en el mantenimiento del embarazo al proporcionar protección multinivel al feto en crecimiento [8, 18, 19]. Las membranas fetales se adaptan a los desafíos constantes (inmunes, estructurales,

mecánicos y endocrinos) durante el embarazo, continúan creciendo y mantienen mecánica y bioquímicamente la elasticidad a los estiramientos experimentados durante el crecimiento fetal [18]. Esto debido a los componentes estructurales del amnios y el corion como ya se describió anteriormente

A pesar de que las membranas que recubren la placenta y el cuello uterino se enfrentan a ambientes con cambios drásticos durante el embarazo, aún mantienen el equilibrio homeostático necesario para mantener el crecimiento fetal sin interrupción [23]. Esta compañía entre el feto y las membranas continúa hasta el término, cuando el feto alcanza la madurez y las membranas alcanzan la longevidad máxima (40 semanas). A medida que las células de la membrana fetal se multiplican y crecen durante el embarazo, experimentan una senescencia celular dependiente de los telómeros, lo que resulta en un fenotipo de envejecimiento indicativo de su esperanza de vida [16, 17]. Los cambios histológicos y bioquímicos asociados con la senescencia y el fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP), son una firma inflamatoria única [18].

Las MFH tienen la capacidad de sintetizar interleucinas anti inflamatorias como es la interleucina 4 (IL-4). La producción de IL-4 aumenta en el estado grávido y los niveles de IL-4 aumentan durante el embarazo normal [24]. La progesterona es un inductor conocido de IL-4 y juntos actúan para inhibir las respuestas Th1 durante el embarazo [25, 26].

Estudios previos realizados en mujeres embarazadas con diferentes edades gestacionales han demostrado que la interleucina 10 (IL-10) es dependiente a la edad gestacional y juega un papel en el crecimiento y la remodelación de la placenta y así inhibe la inflamación excesiva [24]. La interleucina-10 (IL-10) es una citocina antiinflamatoria producida por los tejidos del corion humano, decidual y trofoblasto, sin embargo, se ha observado que la producción coriodecidual basal de IL-10

disminuye significativamente con el trabajo de parto mientras que la prostaglandina PGE 2 y la IL-6 aumentan [27]. Estos resultados sugieren que IL-10 actúa como un agente protector durante la infección y la deficiencia de IL-10 exacerba la inflamación [28].

2.2 Trabajo de parto

Está bien reportado que, a lo largo del proceso del embarazo, las MFH se encuentran en un estado latente, es decir, todo se encuentra sumamente controlado para evitar un trabajo de parto prematuro [19, 23]

Diversas evidencias de trabajos sugieren que el parto humano representa una respuesta inflamatoria [29]. Thomson y colaboradores (1999) encontraron que existen neutrófilos que logran infiltrar tejidos uterinos en el momento del trabajo de parto. Por ejemplo, al iniciar el trabajo de parto se han encontrado cantidades excesivas de neutrófilos, linfocitos T en el miometrio, así como células inflamatorias en la decidua después del inicio del trabajo de parto [30, 31] Los leucocitos en el miometrio, el cuello uterino, la decidua y las membranas expresan citocinas proinflamatorias como la interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 e IL-8 [32, 33].

Bowen y colaboradores (2002) observaron una regulación ascendente de las citocinas proinflamatorias en el líquido amniótico y en los tejidos gestacionales en asociación con el trabajo de parto, apoyando la noción de que el trabajo de parto representa un proceso inflamatorio [29]. Por lo que se llegó a la conclusión de que el RNA mensajero de cada una de las citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral tipo alfa (TNF- α) estaría regulada por incremento en miometrio, cuello uterino y membranas fetales durante el parto [34].

2.3 Parto pretérmino

El parto prematuro (PP) está definido por la Organización Mundial de la Salud como “el parto que se produce antes de las 37 semanas de gestación”, este representa una complicación obstétrica frecuente en el embarazo constituyéndose en la principal causa de muerte perinatal y de secuela a largo plazo del sobreviviente [35]. Se estima que cada año nacen unos 15 millones de niños prematuros. Esa cifra está aumentando (OMS, 2018). El PP y el parto a término tienen un mismo proceso, excepto por la variación en la edad gestacional. Comparten una vía terminal común, sin embargo, el PP es activado como consecuencia de una enfermedad y/o infección, mientras que el parto a término es consecuencia de la activación del trabajo de parto. Esta vía está compuesta por las contracciones uterinas, la dilatación cervical, y la activación de la decidua y membranas fetales [35, 36].

El departamento de estadística del Instituto Nacional de Perinatología (INPer) en la Ciudad de México reportó en el año 2014-2018 que, del total de nacimientos, el 43 % fueron pretérminos (figura 4) y de esos recién nacidos, el 79% fueron pretérminos tardíos, el 15% entre las 29-32 sdg y el 6% correspondían a la prematurez extrema (<28-26 sdg) (figura 5). Las causas más frecuentemente asociadas a la muerte de los recién nacidos fueron las malformaciones congénitas incompatibles con la vida (cardiopatías, trisomías, hernias diafragmáticas, etc.), complicaciones de la prematurez e infecciones (Figura 6).

La evidencia actual sugiere que la principal causa del parto prematuro es infección uterina en un 40% [42].

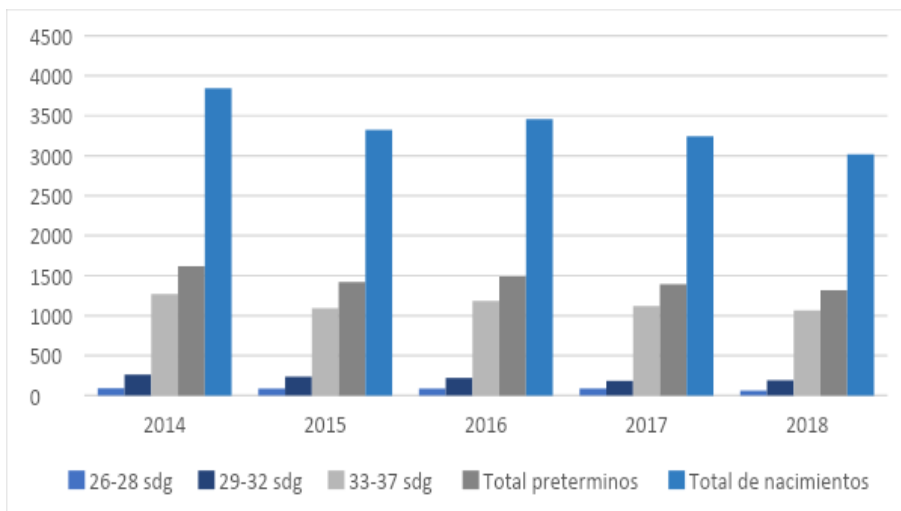


Figura 4. Número de nacimientos por edad gestacional en el INPer del 2014 al 2018

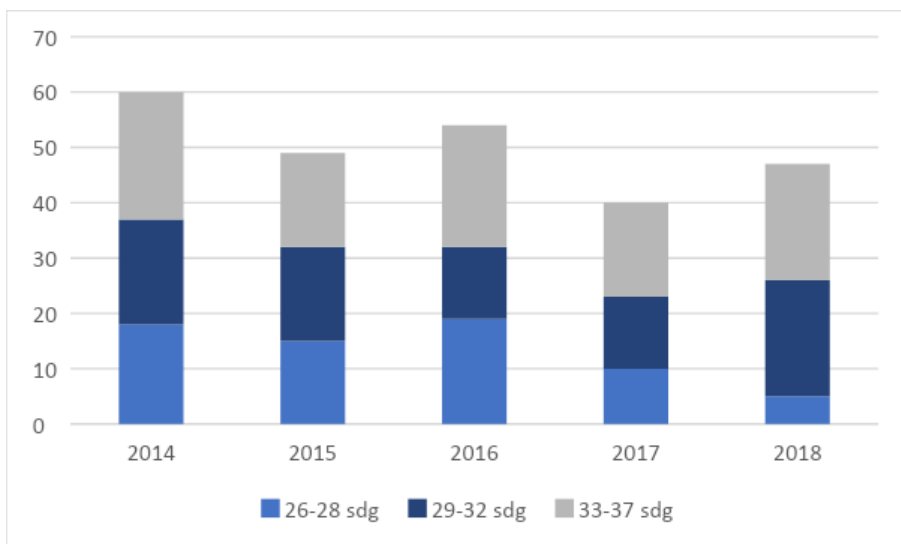


Figura 5. Número de recién nacidos pretérmino muertos en el INPer del 2014-2018

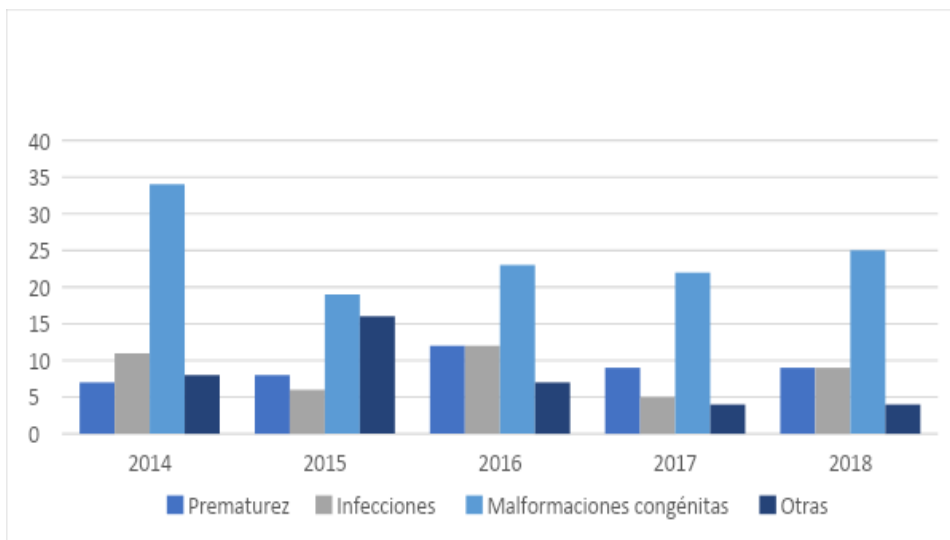


Figura 6. Causas de muerte en recién nacidos pretérmino en el INPer del 2014-2018.

2.4 Ruptura prematura de las MFH

La ruptura prematura de las membranas fetales (pPROM) ocurre antes de las 37 semanas de gestación completa [43]. Afecta al 3-4% de todos los embarazos que son atendidos en la clínica e involucra del 40% al 50% de todos los nacimientos prematuros [43]. La pPROM surge de vías complejas y multifacéticas; algunos factores epidemiológicos y clínicos se consideran precursores de la pPROM, como son las infecciones del tracto intrauterinas (vaginosis bacteriana [VB], tricomoniasis, gonorrea, clamidia y corioamnionitis), factores conductuales (tabaquismo, mal estado nutricional), complicaciones obstétricas (gestación múltiple, cuello uterino incompetente, sangrado gestacional) [37], así como factores ambientales (estrés, exposición a toxinas) y predisposición genética. Por su parte, el feto promueve señales bioquímicas como las señales endocrinas, estas promueven la apoptosis de la membrana fetal por lo que también se implica como un precursor en el inicio de pPROM. [38, 39].

Aproximadamente el 70% de los casos de pPROM están asociados con infección intraamniótica (IAI), según lo documentado por cultivos positivos de líquido amniótico o por evidencia clínica de infección. Informes recientes han indicado que la pPROM puede estar asociada con inflamación estéril en las membranas fetales (una afección inflamatoria que imita la infección sin evidencia de presencia microbiana, ya sea a través de cultivo o métodos moleculares como el fumar) pueden producir inflamación estéril en las membranas fetales que conducen a un estado inmunocomprometido que permite la invasión microbiana [40].

2.5 Infecciones intrauterinas

Las infecciones intrauterinas (IU) se definen como aquellas infecciones que se dan en cualquier región anatómica del útero en el proceso de gestación [41]. Las IU son una causa importante de parto prematuro con y sin membranas intactas. Estas se encuentran presentes en aproximadamente el 25% de todos los nacimientos prematuros, cuanto más temprana es la edad gestacional al momento del parto, mayor es la frecuencia de infección [42]. Un proceso infeccioso en el embarazo generalmente desemboca en un síndrome de respuesta inflamatoria fetal provocado en respuesta a productos microbianos se asocia con el inicio inminente del trabajo de parto prematuro y también con la participación de órganos multisistémicos en el feto humano y una mayor tasa de morbilidad perinatal [43].

Al tener una infección intrauterina la función inmunológica y mecánica de las membranas fetales se ve comprometida por lo que permite la invasión microbiana del tracto genital [43, 44] la activación de la respuesta inflamatoria del huésped que conduce a la disrupción mecánica mediada por la colagenólisis y el debilitamiento de la membrana que predispone las membranas a la pPROM. Esto debido a las proteasas asociadas con la infección o la inflamación pueden activar MMP endógenas en las membranas fetales, lo que lleva a la renovación del colágeno y al debilitamiento de la membrana. [16, 41, 42].

2.6 Agentes patógenos

Existe una gran variedad de microorganismos patógenos que han sido asociados a las IU como los agentes causales de cuadros infecciosos que llegan a provocar un PP [35]. Los microorganismos con mayor incidencia son: Streptococcus del grupo B, Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Ureaplasma urealyticum y los microorganismos que causan vaginosis bacteriana como los anaerobios facultativos como Escherichia coli, Gardnerella vaginalis, micoplasmas genitales y Mobiluncus sp. La vaginosis bacteriana es una condición de desbalance de la flora comensal. Se caracteriza por la reducción o ausencia de la flora lactobacilar y su reemplazo por otros microorganismos patógenos para el humano como son G. vaginalis [41].

La vía demostrada para la invasión microbiana de la cavidad amniótica más frecuente es la ascendente desde la vagina y el cuello uterino [40]. Romero y colaboradores (2001) propusieron un modelo de cuatro etapas progresivas de la infección uterina (figura. 7). En la primera etapa hay un sobrecrecimiento de microorganismos patógenos o facultativos en la vagina y cuello uterino. En la segunda etapa los microorganismos acceden a la cavidad uterina localizándose en la decidua y generando una reacción inflamatoria local, y posteriormente una extensión al corión.

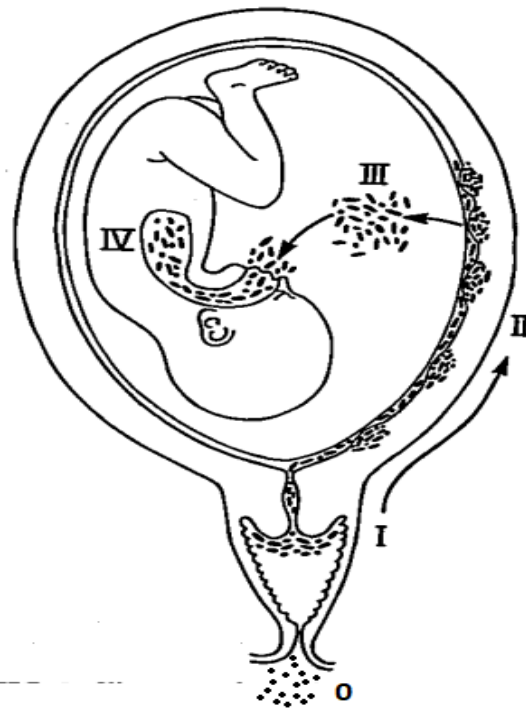


Figura 7. Etapas de la infección ascendente en PP. Imagen tomada de Romero 2001.

En la tercera etapa de la infección llega hasta el amnios (amnionitis) y posteriormente a la cavidad amniótica. La ruptura de las membranas no es

estrictamente necesaria para la invasión de las membranas fetales ya que los microorganismos pueden cruzar las membranas íntegras. En la última etapa las bacterias acceden de la cavidad amniótica es correcto este término al feto por diferentes accesos como una infección localizada en la decidua parietal a la decidua basal y desde ahí directamente a la circulación venosa fetal [35, 43].

Estos microorganismos que ingresan por vía ascendente son reconocidos por receptores tipo Toll, y otros receptores de reconocimiento de patrones [45, 49], posteriormente estos activarán el sistema inmunológico innato, induciendo una cascada proinflamatoria orquestada por, entre otros elementos, el factor de transcripción NF- κ B [50]. Esta cascada da como resultado la síntesis de moléculas como las citocinas (IL) -1 [25, 26], TNF- α [46], quimiocinas, prostaglandinas [48], proteasas, metaloproteasa para el debilitamiento de la MEC [20, 46, 47] y otras enzimas, para producir una respuesta coordinada con contracciones, desprendimiento de placenta, infiltración de células inflamatorias en los tejidos gestacionales [30], una serie de cambios bioquímicos y estructurales en el cuello uterino conocidos como "maduración" y debilitamiento de las membranas fetales [33, 37]. El proceso general que se lleva a cabo cuando hay una invasión microbiana se resume en la figura 8.

La inflamación es un proceso regulado, por el cual el cuerpo responde a estímulos perjudiciales en un intento de limitar el alcance del daño y reparar los tejidos afectados. En mujeres embarazadas la respuesta inflamatoria es una reacción de autoconservación para la madre, el feto o ambos [37, 43, 45].

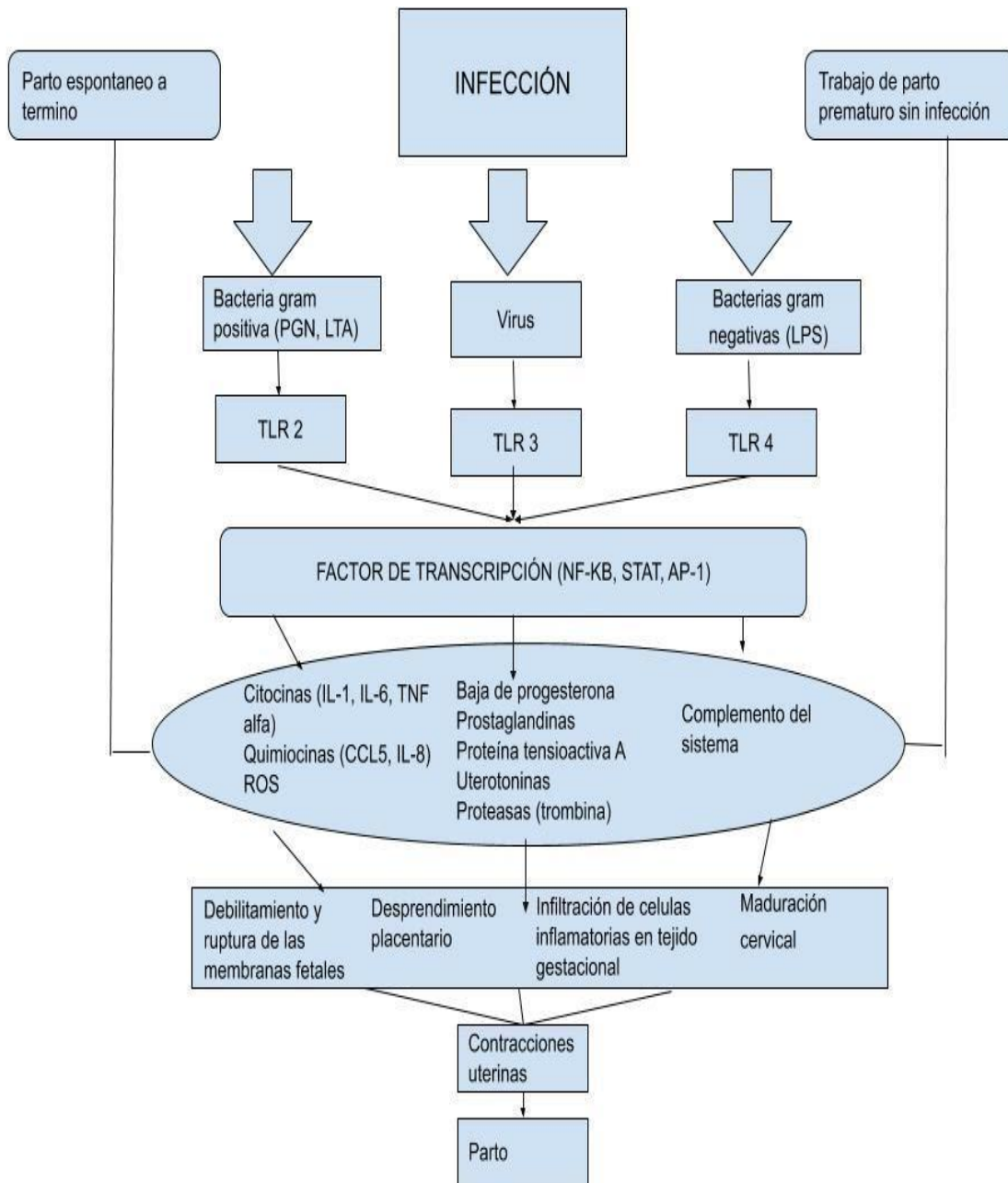


Figura 8. Descripción general de las vías propuestas de trabajo infeccioso y no infeccioso. AP-1, proteína activadora 1; CCL5, quimiocina (motivo CC) ligando 5; dsRNA, ARN bicatenario; IL, interleucina; LMW-HA, hialuronano de bajo peso molecular; LPS, lipopolisacárido; LTA, ácido lipoteicoico; NFκB, factor nuclear κB; PAF, factor activador de plaquetas; PGN, peptidoglucano; STAT, transductores de señal y activadores de transcripción; TNF, factor de necrosis tumoral. Modificado de Varkha 2011

2.6.0 *Escherichia coli* como agente patógeno en IU

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa y pertenece a la familia Enterobacteriaceae, se caracteriza por tener la forma de bacilo. Actualmente existen cuatro grupos filogenéticamente reconocidos; A, B1, B2 y D [51]. Estos grupos se lograron identificar mediante la técnica de electroforesis de enzimas multilocus, también se recuperaron mediante la tipificación de secuencias multilocus utilizando 2,6 millones de nucleótidos del genoma de *E. coli*, indicando que estos grupos son entidades genéticas, por lo que estos grupos son útiles para agrupar cepas de manera relevante [52].

Este microorganismo es sumamente importante en la vida de los animales de sangre caliente, debido a que se considera como un componente casi universal en el microbiota de humanos y animales [52, 54]. *E. coli* es considerada generalmente como un microorganismo comensal, sin embargo, también ha sido catalogada como una bacteria patógena, siendo relacionada a diversas complicaciones del tipo genitourinarias, obstétricas y neonatales, así como la diarrea, infecciones del tracto urinario (ITU) y en el embarazo compromete el desarrollo a término y puede conducir a la infección de un recién nacido in útero por vía ascendente. La infección con *E. coli* ocurre con mayor frecuencia como resultado de la ruptura prematura de membranas. [55, 56].

Las cepas de *E. coli* que son catalogadas como comensales generalmente son del grupo A, mientras que las cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales son pertenecientes al grupo B2 y en menor medida al grupo D. Las cepas patógenas probablemente se derivaron de cepas comensales tras la adquisición horizontal de genes y operones cromosómicos y extra cromosómicos, así como la pérdida de genes [53].

2.7 ÁCIDO RIBONUCLEICO (RNA)

Las células eucariontes poseen un núcleo en donde se localiza la información genética, esta se encuentra embebida en el DNA. El DNA cumple con la función de sintetizar RNA por medio de la transcripción [57]. El RNA es una cadena sencilla de polinucleótidos que contiene la base uracilo esta una característica distintiva entre el DNA y el RNA. [58, 59]. Su principal función es codificar proteínas, se tienen bien identificados tres tipos de RNA como son el mRNA (mensajero), rRNA (ribosomal) y tRNA (transferencia), su nombre se les otorgó por la función que realizan [57] sin embargo de todo el DNA que se transcribe, una pequeña fracción del RNA es el que logra codificar proteínas. Se han descrito otros tipos de RNA no codificantes (ncRNA) [57, 60].

Los ncRNA se descubrieron hace aproximadamente 60 años y a lo largo del tiempo se ha logrado dividir en 2 categorías: RNA de mantenimiento y RNA reguladores [61]. Actualmente se conocen diversos tipos de RNA en células eucariontes (Fig. 9 A) donde generalmente la gran mayoría de RNA celular humano se compone de rRNA (>90%), tRNA, mRNA, snRNA, y snoRNAs, miRNA y piRNA (Fig. 9 B). Los miRNA y piRNA pueden estar presentes en niveles muy altos; sin embargo, esto parece depender del tipo de célula [62].

Tipo	% total de RNA por masa	Moléculas por célula	Tasa de crecimiento KB	Peso total Picogramos/cel	Notas	Referencia
rRNAs	80 to 90	3–10 × 10 ⁶ (ribosomes)	6.9	10 to 30		Blobel and Potter (1967), Wolf and Schlessinger (1977), Duncan and Hershey (1983)
tRNA	10 to 15	3–10 × 10 ⁷	<0.1	1.5 to 5	About 10 tRNA molecules /ribosome	Waldron and Lacroute (1975)
mRNA	3 to 7	3–10 × 10 ⁵	1.7	0.25 to 0.9		Hastie and Bishop (1976), Carter et al. (2005)
hnRNA (pre-mRNA)	0.06 to 0.2	1–10 × 10 ³	10*	0.004 to 0.03	Estimated at 2–4% of mRNA by weight	Mortazavi et al. (2008), Menet et al. (2012)
Circular RNA	0.002 to 0.03	3–20 × 10 ³	~0.5	0.0007 to 0.005	Estimated at 0.1–0.2% of mRNA**	Salzman et al. (2012), Guo et al. (2014)
snRNA	0.02 to 0.3	1–5 × 10 ⁵	0.1–0.2	0.008 to 0.04		Kiss and Filipowicz (1992), Castle et al. (2010)
snoRNA	0.04 to 0.2	2–3 × 10 ⁵	0.2	0.02 to 0.03		Kiss and Filipowicz (1992), Cooper (2000), Castle et al. (2010)
miRNA	0.003 to 0.02	1–3 × 10 ⁵	0.02	0.001 to 0.003	About 10 ⁵ molecules per 10 pg total RNA	Bissels et al. (2009)
7SL	0.01 to 0.2	3–20 × 10 ⁴	0.3	0.005 to 0.03	About 1–2 SRP molecules/100 ribosomes	Raue et al. (2007), Castle et al. (2010)
Xist	0.0003 to 0.02	0.1–2 × 10 ³	2.8	0.0001 to 0.003		Buzin et al. (1994), Castle et al. (2010)
Other lncRNA	0.03 to 0.2	3–50 × 10 ³	1	0.002 to 0.03	Estimated at 1–4% of mRNA	Mortazavi et al. (2008), Ramsköld

Figura 9. Diversidad de RNAs en una célula de mamífero típica. Tomado de Palazzo 2015.

2.7.0 MicroRNAs (miRNAs)

Los microRNAs (miRNAs) son pequeños RNA de aproximadamente 22 nucleótidos que se caracterizan por no poseer la capacidad de codificar para proteínas [62]. Sin embargo, funcionan como moléculas guía en diversas vías de silenciamiento génico, gracias a la capacidad de reconocer, por complementariedad de bases, ciertas regiones de un RNA mensajero blanco. Esta unión resulta en la inhibición de la expresión de dicho mensajero, es decir, su silenciamiento [63, 64]

Un grupo de investigadores en la universidad de Harvard fueron los responsables del descubrimiento de los miRNAs, estos se encontraban estudiando el proceso larvario del nematodo *Caenorhabditis elegans*, su interés se centraba en el gen lin-4 [65]. Antes de este descubrimiento se creía que el gen lin-4 codificaban para

proteínas como se conocía hasta ese momento, sin embargo, los laboratorios Ruvkun y Ambros (1993) descubrieron que lin-4 no codifican una proteína sino que es un RNA regulador de 22 nucleótidos. Demostraron que el RNA lin-4 podría emparejarse por complementariedad de bases con el mRNA para otro gen en la red de desarrollo de *C. elegans*, lin-14 y controlar la producción de la proteína LIN-14, ya que tiene la capacidad de bloquear su traducción [66]. Posterior a este descubrimiento empezó a producirse más investigación de los miRNAs, como el descubrimiento del let-7. El descubrimiento del miRNA let-7 fue fundamental para estructurar la importancia de estos, ya que ahora se sabe que este miRNA se encuentra presente en diversos organismos incluyendo al humano lo que sugeriría el papel que juegan en la biología humana [67].

A pesar de que su descubrimiento fue reportado en 1993 no fue hasta el 2001 que se les dio el nombre de microRNAs ya que en ese año se descubrieron decenas de microRNAs el mismo nemátodo (*C. elegans*), en plantas (*A. thaliana*) en moscas (*D. melanogaster*) y en vertebrados (*Homo sapiens*) [68].

2.7.1 Biogénesis de los miRNAs

Para la síntesis de los miRNA ocurre un proceso llamado biogénesis. La biogénesis consiste en una serie de pasos donde el miRNA primario largo se convierte en un miRNA maduro de aproximadamente 22 nucleótidos [57].

Los genes que codifican miRNAs se encuentran en todo el genoma, cuyo único producto transcripcional es el miRNA. En otros casos, el miRNA se encuentra dentro de un intrón o región no traducida (UTR) de un gen codificador de proteínas[62]. El 50% de todos los mirNAs identificados hasta el momento son considerados intragénicos ya que son procesados a partir de intrones. El resto de los miRNAs son intergénicos transcritos independientemente del gen huésped y son regulados por

sus propios promotores [57, 63].

Se ha reportado que la vía responsable de la generación de la mayoría de los miRNAs maduros es la vía canónica, sin embargo, existen vías alternas nombradas como vías no canónicas.

La biogénesis canónica es la ruta dominante para la maduración de los miRNA y esta comienza con la RNA polimerasa tipo II (en menor medida la RNA polimerasa III), esta es responsable de la transcripción del gen que contiene al miRNA, una vez que se llevó a cabo la transcripción se forma el pri- miRNA (precursores largos de RNA) [64]. Los pri-miRNA se caracterizan por tener una estructura en forma de horquilla compuesta de un tallo de aproximadamente 33 pb y un bucle terminal, así como segmentos flanqueantes de RNA de cadena sencilla (ssARN, del inglés single strand RNA). El pri-miRNA pasa por varias ediciones para su maduración y posteriormente se forme un pre- miRNA. Para que se inicie el proceso de maduración se necesita la presencia de un complejo microprocesador, este complejo está formado por una proteína de unión a RNA del Síndrome de DiGeorge, Región Crítica 8 (DGCR8) y una enzima ribonucleasa III, Drosha [57, 69].

DGCR8 reconoce un GGAC N6-metiladenilado y otros objetivos como los segmentos de ssARN y el tallo del pri- miRNA, permitiendo que Drosha separe aproximadamente 11 pb, contadas a partir de la unión RNA de cadena sencilla dentro del pri-miRNA [69]. El complejo microprocesador genera una horquilla de 70 nucleótidos al cual se le denomina pre-miRNA. Los pre-miRNAs poseen dos nucleótidos en su extremo 3' y un grupo fosfato en el extremo 5', lo cual es característico de los RNA procesadas por la Ribonucleasa III [64]. Finalmente, los pre-miRNAs son exportados del núcleo al citoplasma por medio de la exportina 5 dependiente de Ran-GTPasa. En el citoplasma, los pre-miRNAs son reconocidos por el complejo de procesamiento de pre-miRNAs formado por Dicer, la proteína de

unión a RNA en respuesta a trans-activación (TRBP, del inglés TAR RNA-binding protein) y la proteína quinasa activadora dependiente de RNA de cadena doble inducible por interferón (PRKRA, del inglés protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator). En el complejo de procesamiento de pre-miRNAs Dicer cliva los pre-miRNAs cerca del bucle terminal, generando un dúplex de miRNA maduro de aproximadamente 22 nucleótidos este dúplex contiene una cadena madura de miRNA y su cadena complementaria, la cadena pasajera. El dúplex es reclutado al complejo conocido como RISC (del inglés "RNA Induced Silencing Complex"). En este complejo se encuentra una proteína llamada Argonata (Ago) cuyas funciones son: 1) degradar una de las dos hebras del RNA pequeño, producto de Dicer, para dar como resultado final al miRNA funcional. La selección de la cadena 5' o 3' se basa en parte en la estabilidad termodinámica en los extremos 5' del dúplex de miRNA o en una 5' U en la posición de nucleótido 1) Generalmente, la hebra con menor estabilidad 5' o uracilo 5' se carga preferentemente en AGO, y se considera la hebra guía, 2) posteriormente argonata se une directamente al miRNA maduro para detener la traducción cuando la homología y por lo tanto su hibridación es parcial; o por el contrario para degradar al RNAm blanco cuando su hibridación con el miRNA es total. En animales, la secuencia o secuencias blanco reconocidas por los miRNAs se localizan generalmente en la region 3' no traducida de los RNA mensajeros. Sin embargo, para algunos miRNAs, ambas cadenas pueden reclutarse en RISC a frecuencias similares. En este caso, la cadena del extremo 5' se denomina "5p" y la cadena de 3' la "3p" [62, 63, 69, 70].

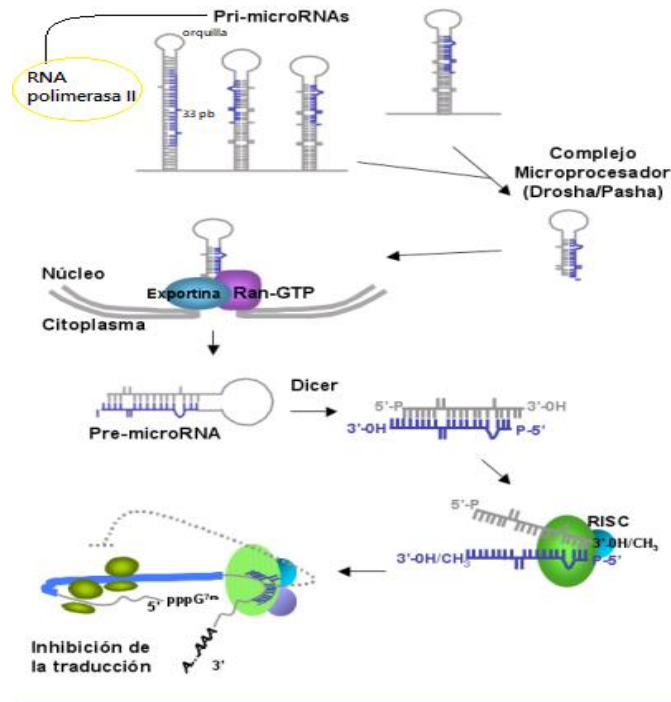


Figura 10. Biogénesis y mecanismo de acción más frecuente en animales. Dos distintos transcritos primarios que pueden ser precursores, ya sea conteniendo uno o varios miRNAs, son primeramente convertidos por el microprocesador en pre-miRNAs que son llevados al citoplasma por exportina 5. El mensajero blanco se muestra unido a ribosomas y a RISC, con el miRNA dirigiendo la inhibición de su traducción. El miRNA se muestra como una cadena en azul a lo largo de su maduración. **Tomado de Flores (2007)**

2.7.2 Importancia biológica

Diversos estudios han reportado la importancia biológica de los miRNAs tanto en vertebrados como invertebrados. En humanos se ha estudiado la participación de estos miRNAs en procesos como proliferación celular, tumorigénesis, inflamación, regulación del ciclo celular, respuesta ante el estrés, diferenciación celular, apoptosis, invasión, regulación de la hematopoyesis, modulación de la miogénesis, cardiogénesis, diferenciación osteogénica y de la piel. También se tiene evidencia de que los miRNAs pueden actuar como oncogenes (oncomirs) [62, 68]. y en estos procesos cual es el papel biológico de los miRNAs. Sin embargo, los mecanismos de acción de estos no están completamente reportados, como se menciono

anteriormente, una de las funciones reportadas para los miRNA es la de moléculas guía en vías de silenciamiento génico.

Al estudiar los perfiles de expresión genética en enfermedades humanas (como el cáncer, enfermedades metabólicas, enfermedades causadas por virus como el herpes) se ha observado una desregularización en la expresión de los miRNA. Se ha mencionado a esta desregularización como un factor causal en la progresión de una amplia gama de enfermedades [71].

Esta desregularización en la expresión de los miRNAs se ha llegado a dar por alteraciones en el número de copias, localización de miRNAs genómicos, alteraciones en la regulación transcripcional de los miRNAs también resultan en enfermedad. Muchos miRNAs homóloga el termino están asociados con la desregulación de ellos mismos y el desarrollo de cáncer como, por ejemplo, la familia del miRNA let-7 está asociada con cáncer gástrico, de próstata, de colon, de ovario, melanoma, linfoma [62, 64, 66].

La importancia biológica de los miRNAs en el desarrollo de los mamíferos se demostró por primera vez con la generación de modelos de ratones deficientes para Dicer y DGCR8 (Drosha está involucrado en otras vías metabólicas de RNA, mientras que DGCR8 es específico para la biogénesis de miRNA) [69]. La pérdida de cualquiera de los pasos en la biogénesis de miRNA produce letalidad embrionaria.

2.7.3 Función del miRNA 372-5p

Se ha determinado que el miR-372-5p está asociado a procesos proinflamatorios, Zhou y colaboradores (2017) demostraron en un sistema de medula espinal que, las regiones 3' no traducidas (UTRs) de KIF3B y NOSIP

contienen secuencias dirigidas a miR-372 que inhiben directamente su expresión[72] sin embargo al existir una inflamación excesiva inducida por la IL-1 la expresión del miRNA 372-5p aumento, lo que redujo de manera significativa la expresión de KIF3B (miembro de la familia de la kinesina 3B) y NOSIP (proteína que interactúa con el óxido nítrico sintasa), estos son dos moduladores clave para restringir la inflamación y promover la regeneración neuronal en el desarrollo de la médula espinal, por lo que la inflamación inducida por IL- 1 y la expresión del miRNA 372-5p bloquearon la recuperación de una lesión en la medula espinal [73].

Por otro lado, se tienen datos que miR-372 funciona como un supresor de tumores en la progresión del carcinoma de células renales al inhibir la expresión de IGF2BP1. Observaron que la expresión del miR- 372 estaba reducida en líneas celulares de carcinoma de células renales, sin embargo, al inducir una sobreexpresión, este reprimía la proliferación e invasión de células carcinomas renales. Además, IGF2BP1 se identificó como un objetivo y funcional de miR-372-5p al reprimir su expresión al interactuar directamente con su sitio de unión putativo en el 3'-UTR. La expresión ectópica de IGF2BP1 revirtió significativamente la supresión de la proliferación e invasión celular, causada por la sobreexpresión de miR-372 [74].

Por el contrario, Voorhoeve y colaboradores (2006) reportaron que miRNA-372 y miRNA-373 son miRNA tumorigénicos. Examinaron una serie de líneas celulares que se originan a partir de la presencia de tumores testiculares de células germinales de adolescentes y adultos, los miRNAs colaboran con RASV12 y estimulan un fenotipo de transformación neoplásica, en la mayoría de los casos la transformación neoplásica requiere la inactivación de p53 (por expresión de HPV E6, HDM2 o p53 mutante), sin embargo, miRNA 372 y miRNA 273 promovieron la transformación mientras p53 estaba activo. Esto indica que miRNA-372 y 3 no bloquean las señales de RASV12 sino que permiten que las células proliferen

independientemente de la activación de p53 y la inducción de p21cip1 [75].

Recientemente, estudios han demostrado que el miRNA-372 es tumorigénico en cánceres del sistema reproductivo humano, en contraste, Tian (2011) proporciono evidencia que sugiere que el miRNA-372 actúa como un gen supresor de tumores en el carcinoma de cuello uterino. La expresión ectópica de miR-372 suprimió el crecimiento celular mediante la regulación negativa de los genes del ciclo celular CDK2 y ciclina A1, así mismo el miRNA 372 indujo la detención en las fases S / G2 del ciclo celular en células HeLa [76].

2.7.4 Función del miRNA 21-3p

Se ha determinado que el miR-21-3p desempeña un papel crucial en una gran cantidad de funciones biológicas y enfermedades que incluyen el desarrollo celular y morfológico, cáncer, enfermedades cardiovasculares y la inflamación debido a las funciones críticas de sus proteínas blanco en varias vías de señalización. El miR-21 se ha convertido en un blanco molecular atractivo para la modulación genética y farmacológica en diversas enfermedades [77].

Sheedy y colaboradores (2010) han demostrado una regulación positiva de miR-21 por LPS en macrófagos, fibroblastos embrionarios de ratón y en células mononucleares de sangre periférica humana. Encontramos que la inducción de miR-21 por LPS era dependiente de MyD88 y también dependiente de NF- κ B, de acuerdo con la presencia de un sitio de unión a NF- κ B en el promotor miR-21[78]. Hay una regulación positiva de miR-21 en una variedad de estados patológicos. Se ha informado sobreexpresión de miR-21 en muchos tipos de cáncer. Además, se ha informado que miR-21 está regulado al alza en muchos estados inflamados, incluido el pulmón inflamado en ratones tratados con LPS, inflamación alérgica de las vías respiratorias [79], osteoartritis, psoriasis y eccema atópico. Por lo tanto, miR-21

puede ser un indicador de inflamación y, dado su papel en el tumor génesis, podría ser un vínculo importante entre el cáncer y la inflamación.

Ning y colaboradores (2019) estudiaron la participación del miRNA 21 en células de microglía activadas de rata y concluyeron que la inhibición de miR-21 puede promover la recuperación de la lesión de la médula espinal al regular a la baja la vía de señalización de IL-6R / JAK-STAT inhibiendo la respuesta inflamatoria, esto debido a que, al inhibir la expresión del miRNA-21 disminuyeron los niveles de proteína de iNOS, TNF- α , el RNA de IL-6R, JAK y STAT3 en ratas. [80].

3.0 JUSTIFICACIÓN

El nacimiento pretérmino es un problema de salud pública mundial, ya que es causa directa de al menos 70% de los casos de muertes neonatales. *E. coli* y sus componentes estructurales activan una cascada de señalización que desencadenan un proceso inflamatorio ya que activan en el tejido de la coriodecidua la secreción de diferentes mediadores de la respuesta inflamatoria y degradativa. Estudios realizados sugieren que esta respuesta inflamatoria se encuentra mediada por algunos miRNAs, se ha reportado que los miRNA 21 y el miRNA 372 se encuentran expresados en diversos procesos inflamatorios, sin embargo, se desconoce la participación del miRNA 372-5p y del miRNA 21-3p en las MFH ante la infección con *Escherichia coli*.

4.0 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- ✓ Determinar la expresión del miRNA-21-3p y del miRNA-372-5p en las membranas fetales humanas después de la estimulación en el tejido de la coriodecidua con diferentes concentraciones de *E. coli*

4.2 Objetivos particulares

- ✓ Determinar la expresión del miRNA-21-3p y miRNA-372-5p en la región del epitelio amniótico y del tejido de la coriodecidua a las 3, 6 y 24 horas de la estimulación con *E. coli*
- ✓ Comparar la expresión del miR-21-3p y miRNA 372-5p entre la zona estimulada directamente (coriodecidua) y la zona opuesta (amnios).

5.0 HIPÓTESIS

Al estimular el tejido de la coriodecidua humana con *E. coli* se observará una expresión diferencial del miRNA-21-3p y del miRNA-372-5p dependiendo del tiempo y la concentración bacteriana inclinándose hacia una respuesta anti-inflamatoria

6.0 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Aspectos éticos.

Previo a la obtención de las MFH se obtuvo el consentimiento informado de las pacientes en donde se les explicó la finalidad del proyecto de investigación el cual ha sido aprobado por los Comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad institucionales con el número de registro 2017-2-82 (Anexo I). A cada paciente se le entregó la carta de consentimiento informado para que firmaran de manera libre (Anexo II).

6.2 Características de las pacientes.

Se incluyeron en el estudio pacientes con embarazos a término (≥ 37 semanas de gestación), y por indicaciones médicas fueron intervenidas quirúrgicamente por cesárea. En todos los casos, no presentaron trabajo de parto activo, así como signos y síntomas evidentes de infección u otras patologías obstétricas asociadas a la respuesta inflamatoria esto para evitar alteraciones en nuestros resultados.

6.3 Obtención de las MFH

En la unidad de tococirugía del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes se obtuvieron las MFH después de ser desprendida de la placenta materna y el neonato por medio de un bisturí estéril fueron depositadas en un contenedor quirúrgico y posteriormente fueron colocadas en un contenedor estéril para muestras biológica el cual contenía medio DMEN estéril y fueron inmediatamente trasladadas al tercer piso de la torre de investigación para comenzar con el manejo de la muestra.

6.3.1 Procesamiento de las MFH en el sistema de Transwell.

La manipulación del tejido se hizo en una campana de flujo laminar y en condiciones de esterilidad. Las MFH fueron limpiadas con solución salina para quitar toda la sangre adherida al tejido sin permitir que este sufriera separación de las capas del amnios y coriodecidua. Posteriormente las MFH fueron cortadas en porciones de 2 cm² aproximadamente y los explantes fueron montados en el sistema de Transwell como ha sido previamente reportado por nuestro grupo de investigación [46, 81]. Este sistema permite tener dos regiones (amnios y coriodecidua) de manera independiente, sin embargo; permite mantener la estructura y comunicación de ambas regiones. Una porción de las MFH se analizó para la detección de bacterias patógenos en el departamento de infectología. Las MFH se incubaron con 1 ml de medio de cultivo DMEM a cada región (AM/CDH) suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SBF) y 1% de penicilina/estreptomina (100 U/mL y 100 µg/mL respectivamente; Gibco, Bethesda, MD, USA) e incubadas a 37°C y 5% de CO₂ por 24 horas. Al término de este periodo, se les retiró el medio de cultivo, a cada región se le adicionó PBS (1x), con la finalidad de eliminar los residuos del SBF este procedimiento se repitió dos veces. Finalmente, a cada región se le adicionó 1 mL de medio de cultivo DMEM suplementado con 0.2% de hidrolizado de lactoalbúmina (DMEM-HLA; Gibco) e incubados en las condiciones arriba descritas.

6.4 Escherichia coli

Escherichia coli es una bacteria Gram-negativa, la cual fue aislada de canal cérvico-vaginal de paciente con datos clínicos de corioamnionitis que presentó ruptura prematura de membranas fetales con más de 72-horas de progresión. La identificación de *E. coli* se realizó por pruebas bacteriológicas que mediante el lector automatizado VITEC a partir del crecimiento en medio McConkey (lactosa positiva),

y su sensibilidad a antimicrobianos por el método de difusión en disco. Su filogenia fue determinada con iniciadores específicos para los genes *chuA* y *yjaA* la cual corresponde al grupo B2 [54]. Dada las características patogénicas de *E. coli* se utilizó campana de bioseguridad nivel II con el siguiente equipo de seguridad personal: cubre bocas, guantes de látex los cuales serán desechados en bolsa de polietileno color roja. Para la protección de los ojos se usarán lentes los cuales fueron limpiados con una gasa roseada de alcohol que fue eliminada en bolsa roja.

6.4.1 Estimulación de las MFH con E. coli

Las MFH se estimularon con *E. coli* a diferentes concentraciones (10^2 , 10^4 , 10^5 , 10^6 UFC/ml) por 3, 6 y 24-horas y en cada intervalo de tiempo se manejó un control experimental. El medio de cultivo se recuperó a las 3, 6 y 24 horas después de la estimulación y en cada caso las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se recuperó en tubo Eppendorf y se almacenó a -70 °C para determinar el perfil de expresión del miR-21-3p y del miR-372-5p a partir del RNA total.

6.5 Extracción del RNA total.

A 500 μ l de medio de cultivo de cada procedimiento de estimulación se le adicionó el mismo volumen de TRIzol (InvitroGen; Carlsbad, CA) la mezcla se agitó vigorosamente por 15 seg y se incubaron por 15 min a 30°C. Posteriormente a cada muestra se les añadió 100 μ l de cloroformo (Invitrogen), se agitaron por 15 seg. y fueron incubadas por 5 min a 30°C. Al término las muestras fueron centrifugadas a 4 000 rpm por 15 min y la fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se le agregó 550 μ l de isopropanol (Invitrogen) y 1 μ l de Glucógeno (Invitrogen). Posteriormente

se incubaron por 1 hora a -20°C. Al término de este tiempo las muestras se centrifugaron a 4 000rpm por 30 min. Al pellet se le adicionó 1 ml de etanol al 100% y se agito vigorosamente por 15 seg., y fue centrifugado nuevamente a 4000 rpm por 15 min. El procedimiento se repitió una vez más con etanol al 75%. El RNA fue evaporado toda la noche a temperatura ambiente, y al día siguiente fue hidratado con 20 µl de agua inyectable.

6.5.1 Reacción de RT-PCR

Para la obtención del cDNA se utilizó el kit Access RT-PCR System (RT-PCR, cat A1250; Promega Madison WI, USA). Se tomaron 10 ng de cada una de las muestras y se preparó el mix de RT con 5 µL de Buffer AMV-Tfi 5X, 1 µL dNTP [10 mM], 2 µL MgSO₄ [50 mM], 10 µL agua libre de RNAsas, 1 µL de AMV RT y 1 µL de iniciador específico de RT miRNA 372 y 21 [20 pmol; [tabla 2]. La síntesis del cDNA se realizó durante 45 minutos a una temperatura de 45°C.

miRNA	Secuencia 5'- 3'	Número de pb
372-5p	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA GAA TA	50
21-3p	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA CAG CC	50

TABLA 2. Secuencia de iniciadores específicos para RT. La secuencia de los iniciadores fue diseñada a partir de la secuencia de hsa-miR-372 y -21 maduros obtenida por el sitio web www.mirBase.org

6.5.2 Reacción de PCR

A partir del cDNA obtenido se trabajó con 10 µL del mismo y con un mix de PCR el cual contenía 5 µL de Buffer AMV-Tfi 5X, 1 µL dNTP [10 mM], 2 µL MgSO₄ [50 mM],

10 µL agua libre de RNAsas, 1 µL de Tfi, 1 µL de iniciador específico para PCR miR-372 y 21 [20 pmol] y 1 µL iniciador universal [20 pmol; tabla 3]. Cada uno de los tubos fueron procesados en el termociclador con el siguiente programa: 94°C para una elongación inicial durante un minuto y 40 ciclos con 94°C durante 30 segundos, 56°C en 30 segundos, 72°C durante 30 segundos. Se realizó una elongación final de 72° durante 10 minutos.

miRNA	Secuencia 5'- 3'	Número de pb
372-5p	CGG CCG CCT CAA ATG TG	17
21-3p	CGG CCG CAA CAC CAG T	16
Universal (Rev)	GTG CAG GGT CCG AGG T	

Tabla 3. Secuencia de iniciadores específicos para PCR. La secuencia de los iniciadores fue diseñada a partir de la secuencia de hsa-miR-372 y -21maduros obtenida por el sitio web www.mirBase.org

6.5.3 Visualización de las bandas de expresión del miR-372-5p y del miR-21-3p

Los amplificados se trabajaron en geles de agarosa al 4% a voltaje constante por 40 minutos y las bandas se visualizaron en luz UV. Las imágenes fueron capturadas usando el sistema fotodocumentador (Gel Doc 2000. Bio-Rad, USA). El perfil de las bandas del miR-372-5p y miR-21-3p en las diferentes condiciones experimentales de infección fueron determinadas mediante la densidad óptica utilizando el programa ImageJ (NIH; USA).

6.6 Análisis estadístico

Los datos de expresión fueron reportados como la media \pm desviación estándar y la comparación entre los tratamientos se realizó mediante la prueba de ANOVA de una sola vía seguida de la Tukey con una diferencia estadística menor a 0.05.

7.0 RESULTADOS

7.1 Características de las pacientes

En el periodo de mayo del 2018 a abril del 2019 se obtuvieron un total de 6 membranas fetales humanas. En todos los casos se determinó la identificación de bacterias patógenas la cual se realizó en el departamento de Infectología del INPer. Las seis de las MFH fueron procesadas y montadas en el sistema de Transwell.

7.2 Estandarización de las condiciones de PCR para el miRNA 372-5p

Antes de determinar el perfil de expresión de miR-372-5p en el tejido de la coriodecidua (CDH) estimulando con diferentes concentraciones de *E. coli* y en la región del amnios (Am) se realizó la estandarización de este para encontrar la temperatura óptima de alineamiento de RT/PCR mediante la expresión de tejido placentario humano. La figura 11 muestra la banda de expresión tomando como base $52 \pm 1^\circ\text{C}$.

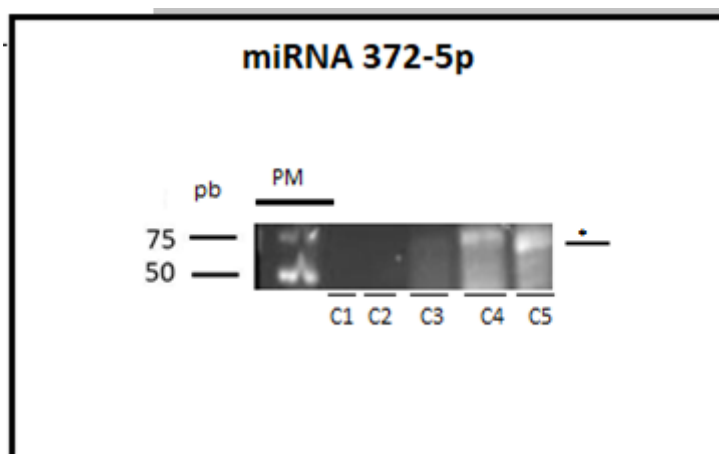


Figura 11. Estandarización de las condiciones de temperatura de alineamiento de PCR del miR-372-5p. Marcador de peso molecular (PM de 100 pares de bases; invitrogen), carril 1 vacío, carril 2 control negativo. C3-C5 tejido de placenta humano a 51, 52 y 53 °C respectivamente. La expresión muestra una banda de aproximadamente 73 pb (*) que corresponde a la temperatura de 53°C en tejido de placentario.

7.3 Perfil de expresión del miR372-5p

7.3.1 Expresión a las 3-horas

La figura 12 se muestra la banda de expresión (A) y su densidad óptica (B) tanto de la región estimulada directamente (CDH) con *E. coli* como de la cara opuesta (Am) de cada una de las condiciones de estimulación.

A las 3 horas observamos que la expresión del miR-372-5p en la CHD sin estimulación fue de 38.0 ± 3.0 (figura 12B). La estimulación con *E. coli* (10^2 UFC/mL) mostró una disminución de 1.05-veces (36.33 ± 4.5); sin embargo, no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p=0.189$). En la estimulación con 10^4 , 10^5 , y 10^6 UFC/mL observamos un incremento en la expresión del miR-372-5p de 1.14-, 1.2- y 1.2-veces; sin embargo, en todos los casos no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p=0.189$; figura 12 B). A las 3 horas de la estimulación en la CDH con *E. coli* observamos en el tejido amniótico (Am) un aumento significativo en la expresión del miR-372-5p de 2.5-, 1.9-, y 1.7-veces cuando la CDH fue estimulada con *E. coli* (10^4 , 10^5 , 10^6 UFC/mL) con respecto al grupo del amnios sin estimulación (39.67 ± 1.52 ; $p < 0.05$, fig.12C).

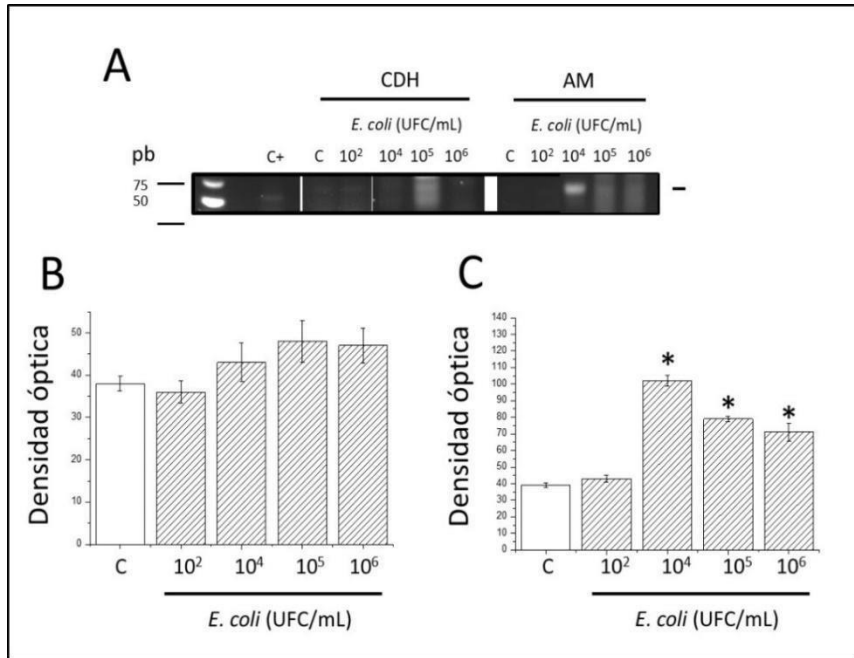


Figura 12. Perfil de expresión del miR- 372 a 3 horas de estimulación con diferentes unidades de Escherichia coli sobre el tejido de la coriodecidua. Se muestra la banda de expresión del miR-372-5p a las 3-horas de estimulación (A). En cada caso se determinó la densidad óptica (unidades relativas) tanto de la región de la coriodecidua (CHD, B) como en la cara opuesta a la estimulación (amnios, C). Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar y con (*) se muestra la diferencia estadística que corresponde a 104, 105, 106. ($p \leq 0.05$).

7.3.2 Expresión a las 6-horas

La figura 13 muestra la banda de expresión (A) y su densidad óptica (B) tanto de la región estimulada directamente (CDH) con *E. coli* como de la cara opuesta (Am) de cada una de las condiciones de estimulación.

A las 6 horas de estimulación con *E. coli* 10⁴, y 10⁵ UFC/mL observamos un aumento en la expresión del miR-372-5p en la CHD de 1.1-, y 1.4-veces con respecto al grupo control (36.0 \pm 1.0; $p < 0.05$, figura. 13B). De manera interesante la estimulación con *E. coli* 10⁶ UFC/mL disminuyó la expresión del miR-372-5p (37.3 \pm 1.0).

A las 6 horas de la estimulación en la CDH con *E. coli* observamos en el tejido

amniótico (Am) un aumento significativo en la expresión del miR-372-5p de 1.3-, y 1.4-veces cuando la CDH fue estimulada con *E. coli* (10^4 , y 10^6 UFC/mL) con respecto al grupo del amnios sin estimulación (25.66 ± 2.5 ; $p < 0.05$, figura.13C)

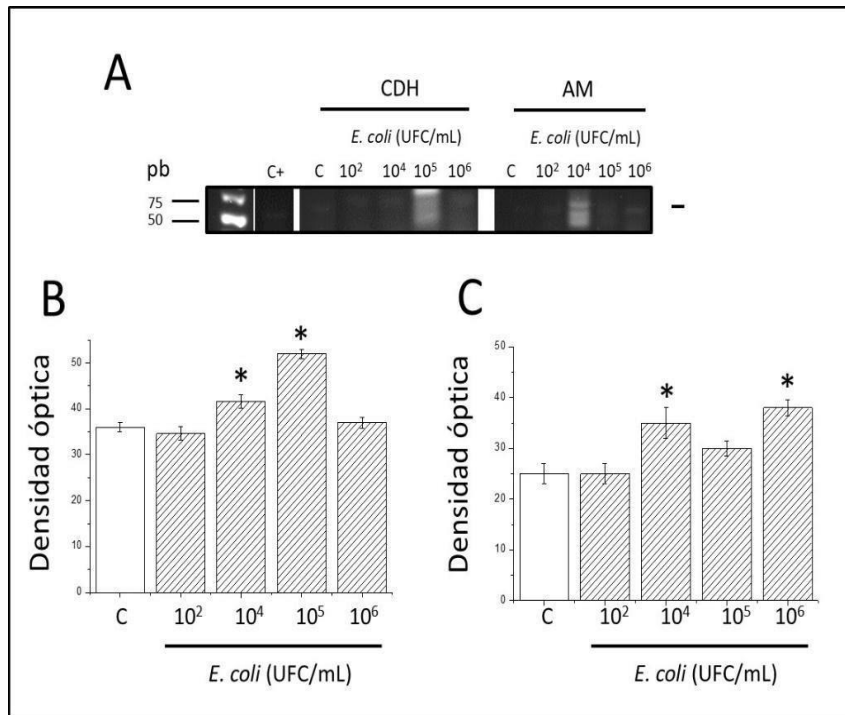


Figura 13. Perfil de expresión del miR- 372 a 6 horas de estimulación con diferentes unidades de Escherichia coli sobre el tejido de la coriodecidea. Se muestra la banda de expresión del miR-372-5p a las 6-horas de estimulación (A). En cada caso se determinó la densidad óptica (unidades relativas) tanto de la región de la coriodecidea (CHD, B) como en la cara opuesta a la estimulación (amnios, C). Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar y con (*) se muestra la diferencia estadística ($p \leq 0.05$).

7.3.3 Expresión a las 24-horas

La figura 14 muestra la banda de expresión (A) y su densidad óptica (B) tanto de la región estimulada directamente (CDH) con *E. coli* como de la cara opuesta (Am) de cada una de las condiciones de estimulación.

A las 24 horas de estimulación con *E. coli* 10^2 , 10^4 , 10^5 y 10^6 UFC/mL observamos

una disminución en la expresión del miR-372-5p en la CHD de 1.2-, 1.2-, 1.6-, y 1.7- veces con respecto al grupo control (21 ± 2.0 ; $p < 0.05$, figura 14B). Al determinar la expresión del miR-372-5p en la cara opuesta (Amnios) a la zona de estimulación observamos una disminución significativa con 10^5 y 10^6 UFC/mL de 1.5-, y 1,9-veces con respecto al grupo control (22.6 ± 1.5 , $p \leq 0.05$, fig. 14 C).

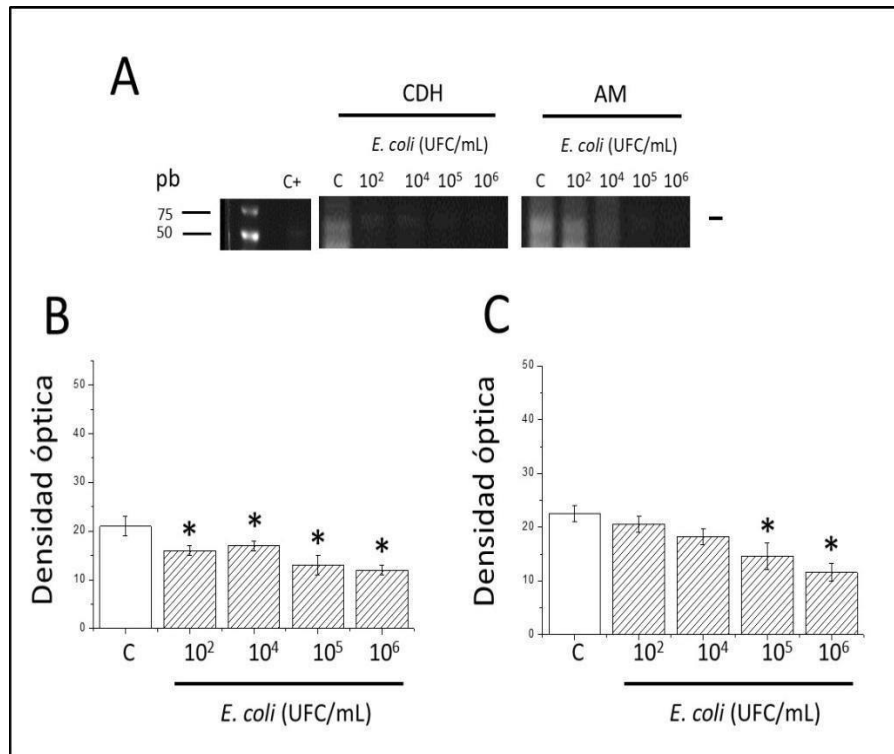


Figura 14. Perfil de expresión del miR- 372 a 24 horas de estimulación con diferentes unidades de Escherichia coli sobre el tejido de la coriodescuidua. Se muestra la banda de expresión del miR-372-5p a las 24-horas de estimulación (A). En cada caso se determinó la densidad óptica (unidades relativas) tanto de la región de la coriodescuidua (CHD, 13 B) como en la cara opuesta a la estimulación (amnios, C). Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar y con (*) se muestra la diferencia estadística ($p \leq 0.05$).

7.4 Perfil de expresión del miR- 21-3p

7.4.1 Estandarización de las condiciones de PCR para el miRNA 21-3p

Se realizó la expresión del miRNA 21-3p a tres temperaturas (fig. 15) y se obtuvo una mejor banda de expresión a una temperatura de 71 °C.

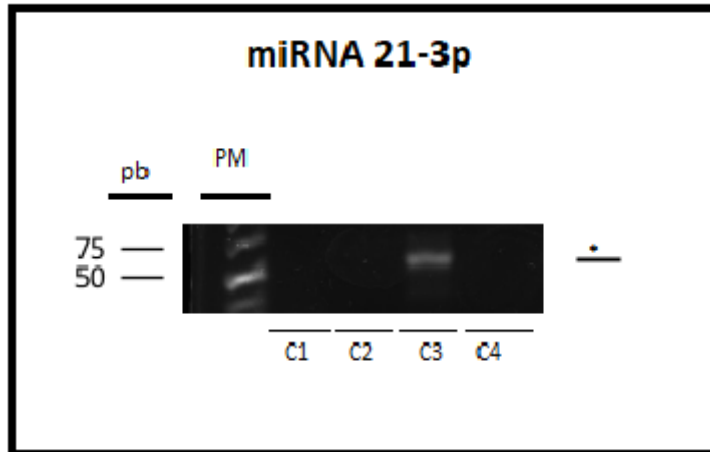


Figura 15. Estandarización de las condiciones de temperatura de alineamiento de PCR del miR-21-3p. Marcador de peso molecular (PM de 100 pares de bases; invitrogen) La estandarización se realizó en células leucémicas que corresponden a 73 pb. La banda de interés se muestra con un *. Del C1-C3 se sometieron a temperaturas de 57, 69 y 71°C respectivamente. La expresión muestra una banda de aproximadamente 73 pb (*) que corresponde a la temperatura de 53°C en tejido de placentario.

7.4.2 Expresión a las 3-horas

La figura 16 muestra la banda de expresión (A) y su densidad óptica (B) tanto de la región estimulada directamente (CDH) con *E. coli* como de la cara opuesta (Am) de cada una de las condiciones de estimulación.

Se muestra el nivel de expresión del miR-21-3p en el tejido de la coriodecidea (CHD) después de ser estimulada con diferentes concentraciones de *Escherichia coli*, así como en su cara opuesta (amnios; AM).

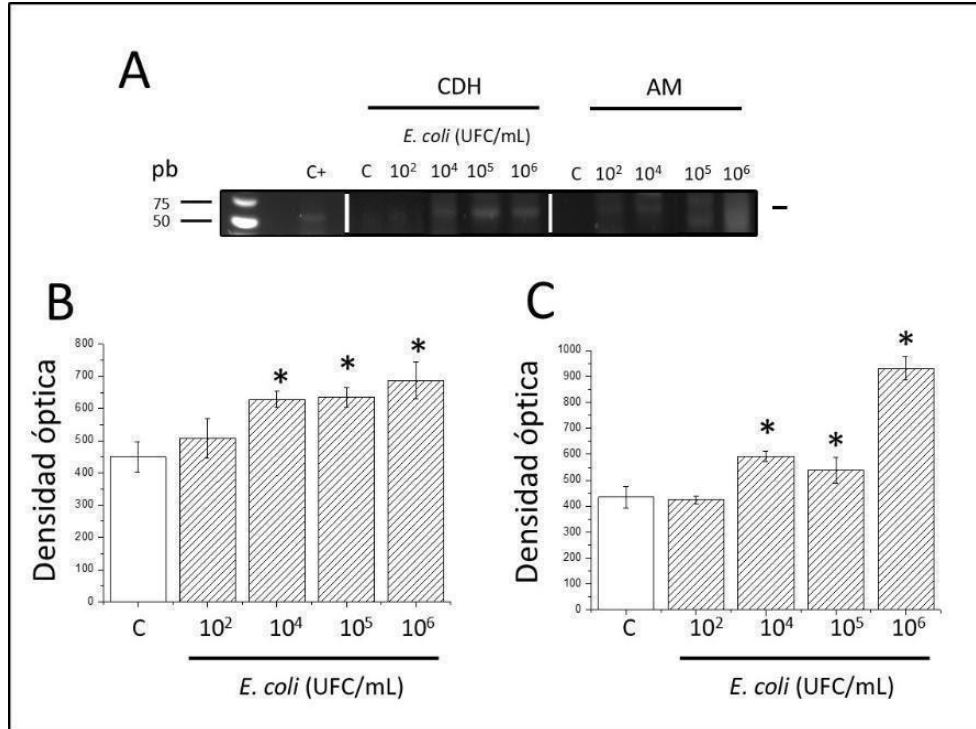


Figura 16. Perfil de expresión del miR-21 a 3 horas de estimulación con diferentes unidades de *Escherichia coli* sobre el tejido de la coriodecidua. Se muestra la banda de expresión del miR-21 a las 3-horas de estimulación (A). En cada caso se determinó la densidad óptica (unidades relativas) tanto de la región de la coriodecidua (CHD, B) como en la cara opuesta a la estimulación (amnios, C). Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar y se indica la diferencia estadística (*) con respecto al grupo control que corresponde a 104, 105, 106. ($p \leq 0.05$).

A las 3 horas observamos que la expresión del miR-21 en la CHD sin estimulación fue de 450.3 ± 46.5 (grupo control; figura. 16B). La estimulación con *E. coli* (10^2 UFC/mL) mostró un incremento de 1.12 veces; sin embargo, no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control. La estimulación con 10^4 , 10^5 , y 10^6 UFC/mL incrementó significativamente la expresión del miR-21 en 1.39, 1.41, y 1.52- veces respectivamente con respecto al grupo control (figura 16B; $p \leq 0.05$).

En este mismo intervalo de tiempo en la cara opuesta (epitelio amniótico; AM) se observó en el grupo control un valor de 434.0 ± 41.2 . Al estimular el tejido de la

coriodecidua con *E. coli* (10^2 UFC/mL) pudimos observar una disminución de 1.01-veces la expresión del miR-21; sin embargo, no encontramos una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control (figura 16C). La estimulación en el tejido de la coriodecidua con 10^4 , 10^5 , y 10^6 UFC/mL incrementó significativamente en el epitelio AM la expresión del miR 21 en 1.36, 1.23, y 2.14-veces con respecto al grupo control del tejido amniótico ($p \leq 0.05$).

7.4.2 Expresión a las 6-horas.

La figura 17 muestra la banda de expresión (A) y su densidad óptica (B) tanto de la región estimulada directamente (CDH) con *E. coli* como de la cara opuesta (Am).

A las 6 horas observamos que la expresión del miR-21 en la CHD sin estimulación fue de 554.3 ± 56.3 (grupo control). La estimulación con *E. coli* a las diferentes UFC/mL mostró una disminución de 1.23, 1.41, 1.43, y 1.32- veces; sin embargo, no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control (figura 17B).

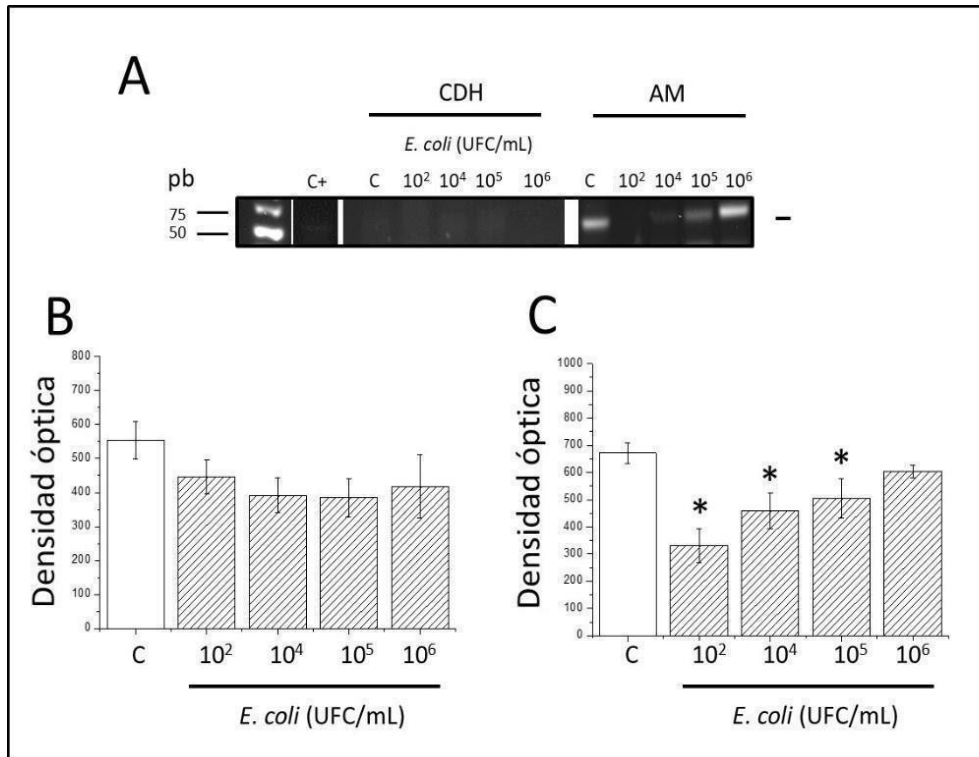


Figura 17. Perfil de expresión del miR-21 a 6 horas de estimulación con diferentes unidades de *Escherichia coli* sobre el tejido de la coriodecidua. Se muestra la banda de expresión del miR-21 a las 6-horas de estimulación (A). En cada caso se determinó la densidad óptica (unidades relativas) tanto de la región de la coriodecidua (CHD, B) como en la cara opuesta a la estimulación (amnios, C). Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar y se indica la diferencia estadística (*) con respecto al grupo control que corresponde a 102, 104, 105. ($p \leq 0.05$).

En este mismo intervalo de tiempo en la cara opuesta (epitelio amniótico; AM) se observó en el grupo control un valor de 671.0 ± 39.9 (figura 17C). La estimulación en el tejido de la coriodecidua con *E. coli* (10^2 , 10^4 , y 10^5 UFC/mL) observamos una disminución significativa de 2.02, 1.45, y 1.33- veces la expresión del miR-21 con respecto al grupo control. La estimulación en el tejido de la coriodecidua con 10^6 UFC/mL disminuyó en el epitelio AM la expresión del miR 21 en 1.10-veces con respecto al grupo control; sin embargo, no fue estadísticamente significativa.

7.4.3 Expresión a las 24-horas

La figura 18 muestra la banda de expresión del miR-21 en el tejido de la coriodescudia (CHD; fig. 18A) después de ser estimulada con diferentes concentraciones de *Escherichia coli*, así como en su cara opuesta (amnios; AM).

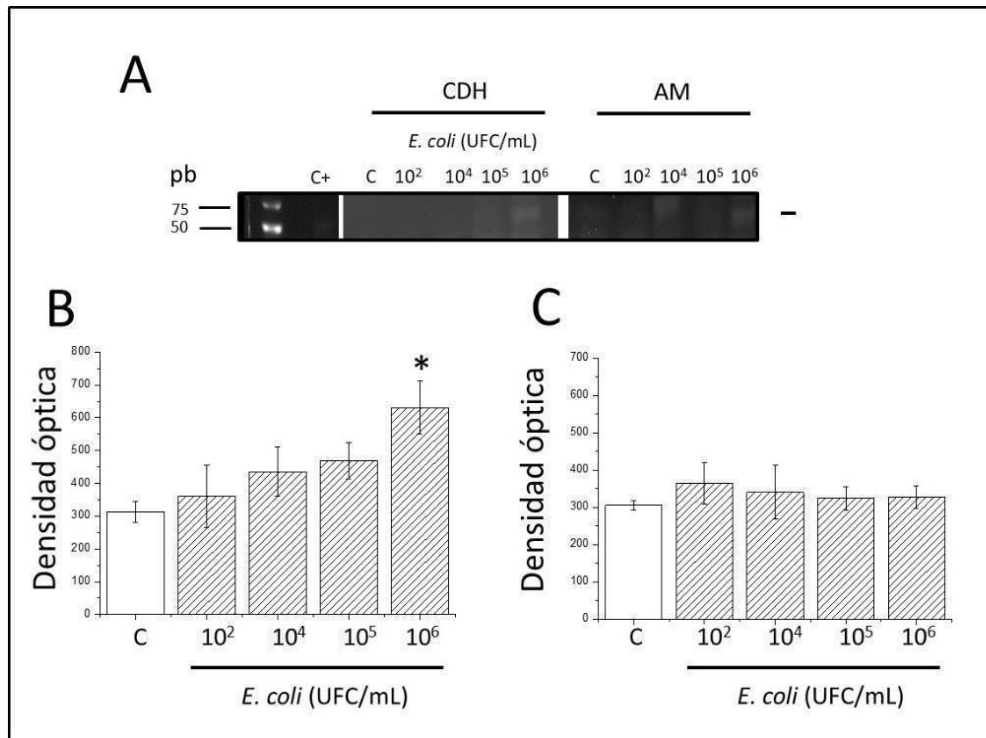


Figura 18. Perfil de expresión del miR-21 a 24 horas de estimulación con diferentes unidades de *Escherichia coli* sobre el tejido de la coriodescudia. Se muestra la banda de expresión del miR-21 a las 24-horas de estimulación (A). En cada caso se determinó la densidad óptica (unidades relativas) tanto de la región de la coriodescudia (CHD, B) como en la cara opuesta a la estimulación (amnios, C). Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar y se indica la diferencia estadística (*) con respecto al grupo control que corresponde a 106. ($p \leq 0.05$).

A las 24 horas observamos que la expresión del miR-21 en la CHD sin estimulación fue de 313.6 ± 32.1 (grupo control). La estimulación con *E. coli* (10^2 , 10^4 , y 10^5 UFC/mL) mostró un incremento de 1.15, 1.39, y 1.49-veces; sin embargo, no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control (figura 18B). La

estimulación con 10^6 UFC/mL incrementó significativamente la expresión del miR-21 en 2.01-veces con respecto al grupo control (fig. 18 B; $p \leq 0.05$).

En este mismo intervalo de tiempo en la cara opuesta (epitelio amniótico; AM) se observó la expresión del miR-21 fue de 305.3 ± 13.8 en el grupo control (fig. 17 C). La estimulación en el tejido de la coriodecidua con *E. coli* (10^2 , 10^4 , 10^5 10^6 UFC/mL) observamos un incremento de 1.19, 1.11, 1.06, y 1.07-veces la expresión del miR-21; sin embargo, no encontramos una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control (figura 18C).

8.0 DISCUSIÓN

En los últimos años, se ha reportado la participación de diferentes miRNAs en procesos inmunológicos como son el cáncer, diabetes y otras enfermedades inflamatorias. Particularmente el miR-372-5p ha sido asociado a diferentes tipos de cáncer [8], sin embargo, aún no se tiene claro la participación de este en las infecciones uterinas que llevan a un parto prematuro

Zhou Wang y colaboradores (2017) demostraron que el miRNA-372-5p afectó significativamente la actividad de numerosas vías, lo que indica cambios en las redes de regulación de genes. Entre todas estas vías, se ha demostrado que el factor nuclear de las células B activadas (NFκB) es la que está más reprimida por miR-372 [76].

Nuestros resultados sugieren que el perfil de expresión del miR-372-5p en la región de la CHD a las 6 horas de la estimulación aumentó significativamente (figura 13) en tanto que a las 24 horas se observó una disminución en el nivel de expresión (figura 14). Este resultado concuerda con resultados previamente obtenidos por Osorio-Caballero, y colaboradores (2015) donde demostraron que a las 24 horas se incrementa la concentración de la IL-1β [34].

Por su parte, la región que mantiene estrecho contacto con el desarrollo fetal es el epitelio amniótico en donde observamos desde las 3 y 6 horas un incremento importante en la expresión del miR-372-5p lo que estaría reduciendo la expresión del NF-κβ y por lo tanto la respuesta inflamatoria como ha sido reportado previamente por Osorio y colaboradores [34]. Borjoquez y colaboradores (2004) demostraron que NF-κβ puede ser la primera respuesta a estímulos celulares nocivos [81]. Los inductores de la actividad del NF-κB son altamente variables, y pueden ser desde especies reactivas de oxígeno (ROS), factores de necrosis tumoral alfa (TNFα), e interleucina de tipo 1-beta (IL-1β) y estímulos mitogénicos

como ésteres de forbol (PMA) relacionados con agentes infecciosos como lipopolisacárido bacteriano (LPS) y expresión de antígenos virales [11, 20]. Los genes de TNF- α , IL-1, del receptor de IL-2 son activados por NF- κ B. También los genes de otros factores de transcripción tienen en sus promotores sitios kB [72, 78].

Por otro lado, el miR-21 ha sido asociado en el proceso inflamatorio debido a las funciones críticas de sus proteínas blanco en varias vías de señalización [77]. Sin embargo, aún no se tiene claro la participación de este en las infecciones uterinas que llevan a un parto prematuro. Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que al estimular directamente en la región de la CDH a 3 horas con *E. coli* se obtuvo un incremento en la expresión del miR-21 estadísticamente significativo (fig. 16B) sin embargo éste, perfil de expresión disminuye a las 6 horas de estimulación con respecto al grupo control (figura 17B). Esto se asocia a que el miR 21 ha sido propuesto como un miR anti inflamatorio [79], por lo que al estimular el tejido de la CDH con *E. coli* se activa la vía de señalización para la síntesis y producción de la IL 1 β . García-Rodríguez y colaboradores (2018) demostraron en pacientes con evidencias clínicas de corioamnionitis (existe un proceso inflamatorio) la disminución en la expresión del miR-21 el cual fue asociado con el incremento de la respuesta inflamatoria de tipo IL-1 β . La respuesta inflamatoria reduce la expresión del miRNA-21 [82].

Los agentes causales de corioamnionitis aislados con mayor frecuencia son bacterias gramnegativas (*Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Chlamydia trachomatis*) [42, 43]. El proceso infeccioso activa la respuesta inmunológica innata del tejido epitelial, de macrófagos, monocitos, células NK y neutrófilos. El reconocimiento de las bacterias activa la secreción masiva de diversas citocinas quimiotácticas (IL-6 e IL-8) e inflamatorias (IL-1 β , y TNF α) [78].

Por otra parte, a las 24 horas de estimulación se notó un nuevo incremento de la

expresión del miR-21 (figura 18B). Lo que nos estaría indicando que el tejido de la CDH a las 24 horas de exposición de *E. coli* estaría reduciendo la respuesta inmunológica; sin embargo, García-Rodríguez y colaboradores (2018) encontraron en pacientes con trabajo de parto se observa un incremento del miR-21 y un decremento en la síntesis de IL-1 β [82]. También se sabe que el receptor 4 similar a Toll (TLR4) puede contrarrestar los efectos tóxicos del LPS [44], lo que permitiría el aumento del miR.

Por su parte, la región que mantiene estrecho contacto con el desarrollo fetal es el epitelio amniótico en donde observamos que a las 3 horas de estimulación la expresión aumenta respecto al grupo control (figura 16C), mientras que a las 6 horas de exposición con *E. coli* se observa un decremento (figura 17C) y finalmente a las 24 horas de estimulación se observa que la variación de la expresión es baja (figura 18C).

A las 3 horas de estimulación con *E. coli* tanto en el tejido de la CDH como el epitelio amniótico se observa un nivel de expresión alto del miR-21 esto nos indica que a este tiempo de exposición aún no se ve una capacidad de respuesta del sistema inmune que desemboque en el proceso inflamatorio lo que nos explicaría el alto nivel de expresión del miR; Sin embargo esto cambia a las 6 horas de estimulación en el epitelio amniótico ya que se observa la baja del miR 21, esto concuerda con trabajos antes mencionados [82]. A diferencia del epitelio amniótico a las 24 horas de estimulación no se incrementa el nivel de expresión del miR-21 lo que nos estaría indicando que la expresión de miR-21 puede estar siendo parcialmente inhibido por las citocinas IL-1 β , IL6, IL 8 y TNF α secretada por la cascada de señalización en respuesta a la infección por *E. coli*. La producción del miR-21 es inducida por TGF- β , mientras que miR-21 reprime a Smad7 promoviendo la activación de fibroblastos (segregan proteínas de colágeno que se utilizan para mantener un marco estructural para muchos tejidos como la MEC) mediada por TGF- β . De esta forma, miR-21

participa en un circuito de retroalimentación positiva con TGF- β .

9.0 CONCLUSIÓN

Es probable que E. coli al incrementar de manera dosis dependiente la expresión del miR-372-5p en la región de la CDH como del epitelio Am inhibe parcialmente en nuestro sistema la expresión del NF- κ B como se ha visto en diferentes estudios.

Mientras que los resultados obtenidos del miR-21 sugieren que 1) la expresión del miR-21 es dependiente del tiempo de estimulación; 2) la región con respuesta dosis dependiente es el tejido de la coriodecidua; y 3) la mayor expresión se obtuvo en el epitelio amniótico después de estimular a la región de la CHD con 106 UFC/mL de Escherichia coli. Estos resultados sugieren que existe una comunicación entre el epitelio de la coriodecidua y el epitelio amniótico como ha sido sugerido previamente por nuestro grupo de investigación mediado por vesículas de transporte

10.0 REFERENCIAS

1. Ferner, K., & Mess, A. (2011). Evolution and development of fetal membranes and placentation in amniote vertebrates. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 178(1). <https://doi.org/10.1016/j.resp.2011.03.029>
2. Perry, J. S. (1981). The mammalian fetal membranes. *Reproduction*, 62(2). <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0620321>
3. Pasquier, J.-C., & Doret, M. (2008). Les membranes fœtales : développement embryologique, structure et physiopathologie de la rupture prématurée avant terme. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de La Reproduction*, 37(6). <https://doi.org/10.1016/j.jgyn.2007.12.001>
4. Parry, J. E., & Priya, S. (1976). A STUDY OF THE ELASTICITY AND TENSION OF FETAL MEMBRANES AND OF THE RELATION OF THE AREA OF THE GESTATIONAL SAC TO THE AREA OF THE UTERINE CAVITY. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 83(3). <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1976.tb00810.x>
5. Reyna, V., Torres, M. (2003). Estructura y función de la matriz extracelular de las membranas fetales humanas. *Rev Obstet Ginecol Venez*, 63(1).
6. Fischman, J. (1994). Anthropology. Putting a new spin on the birth of human birth. *Science*, 264(5162). <https://doi.org/10.1126/science.8178166>
7. Patrick, J., Campbell, K., Carmichael, L., Natale, R., & Richardson, B. (1982). Patterns of gross fetal body movements over 24-hour observation intervals during the last 10 weeks of pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 142(4). [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(16\)32375-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(16)32375-4)
8. Martin, L., Richardson, L., & Menon, R. (2018). Characteristics, properties, and functionality of fetal membranes: An overlooked area in the field of parturition. In *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 387-398). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64498-7>
9. Woessner, J. F. (1993). Introduction to Serial Reviews: The Extracellular Matrix. *The FASEB Journal*, 7(9). <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.9.8330680>
10. Malak, T. M., Ockleford, C. D., Bell, S. C., Dalglish, R., Bright, N., & Macvicar, J. (1993). Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta*, 14(4). [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(05\)80460-6](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(05)80460-6)
11. Richardson, L., Vargas, G., Brown, T., Ochoa, L., Trivedi, J., Kacerovský, M., Lappas, M., & Menon, R. (2017). Redefining 3Dimensional placental membrane microarchitecture using multiphoton microscopy and optical clearing. *Placenta*, 53. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.03.017>
12. Bourne, G.L. (1966) The anatomy of the human amnion and chorion. *Proc R Soc Med* 59, 1127–1128.
13. Litwiniuk, M., & Grzela, T. (2014). Amniotic membrane: New concepts for an old dressing. *Wound Repair and Regeneration*, 22(4). <https://doi.org/10.1111/wrr.12188>
14. Langman, J. (2006). *Embriología Médica*. Editorial médica Panamericana 9ª ed. Madrid, España.
15. Moore, L. K., Persaud, T. V. N., Shiota, K. (1994). *Atlas de embriología clínica*. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. P.p. 78-83

16. Menon, R., Richardson, L. S., & Lappas, M. (2019). Fetal membrane architecture, aging and inflammation in pregnancy and parturition. *Placenta*, 79. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.11.003>
17. Menon, R., Boldogh, I., Hawkins, H. K., Woodson, M., Poletini, J., Syed, T. A., Fortunato, S. J., Saade, G. R., Papaconstantinou, J., & Taylor, R. N. (2014). Histological Evidence of Oxidative Stress and Premature Senescence in Preterm Premature Rupture of the Human Fetal Membranes Recapitulated in Vitro. *The American Journal of Pathology*, 184(6). <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.02.011>
18. Behnia, F., Taylor, B. D., Woodson, M., Kacerovsky, M., Hawkins, H., Fortunato, S. J., Saade, G. R., & Menon, R. (2015). Chorioamniotic membrane senescence: a signal for parturition? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 213(3). <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.05.041>
19. Menon, R. (2016). Human fetal membranes at term: Dead tissue or signalers of parturition? *Placenta*, 44. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.05.013>
20. OGAWA, K., CHEN, F., KUANG, C., & CHEN, Y. (2004). Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor- β is mediated by a nuclear factor- κ B site. *Biochemical Journal*, 381(2). <https://doi.org/10.1042/BJ20040058>
21. Lysiak, J. J., Hunt, J., Pringle, G. A., & Lala, P. K. (1995). Localization of transforming growth factor β and its natural inhibitor decorin in the human placenta and decidua throughout gestation. *Placenta*, 16(3). [https://doi.org/10.1016/0143-4004\(95\)90110-8](https://doi.org/10.1016/0143-4004(95)90110-8)
22. Zare, V. M., et al. (2017). Antimicrobial properties of amniotic and chorionic membranes: A comparative study of two human fetal sacs. *Journal of Reproduction & Infertility*, 18(2), 218–224.
23. Hunt, J. S., & Langat, D. L. (2009). HLA-G: a human pregnancy-related immunomodulator. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(4). <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.05.007>
24. Chatterjee, P., Chiasson, V. L., Bounds, K. R., & Mitchell, B. M. (2014). Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00253>
25. Jones, C. A., Finlay-Jones, J. J., & Hart, P. H. (1997). Type-1 and Type-2 Cytokines in Human Late-Gestation Decidual Tissue¹. *Biology of Reproduction*, 57(2). <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.2.303>
26. MARZI, M., VIGANO, A., TRABATTONI, D., VILLA, M. L., SALVAGGIO, A., CLERICI, E., & CLERICI, M. (1996). Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clinical and Experimental Immunology*, 106(1). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1996.d01-809.x>
27. Hanna, N., Hanna, I., Hleb, M., Wagner, E., Dougherty, J., Balkundi, D., Padbury, J., & Sharma, S. (2000). Gestational Age-Dependent Expression of IL-10 and Its Receptor in Human Placental Tissues and Isolated Cytotrophoblasts. *The Journal of Immunology*, 164(11). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.11.5721>
28. Simpson, K. L., Keelan, J. A., & Mitchell, M. D. (1998). Labor-Associated Changes in Interleukin-10 Production and Its Regulation by Immunomodulators in Human

- Choriodecidua. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(12). <https://doi.org/10.1210/jcem.83.12.5335>
29. Bowen, J. M., Chamley, L., Keelan, J. A., & Mitchell, M. D. (2002). Cytokines of the Placenta and Extra-placental Membranes: Roles and Regulation During Human Pregnancy and Parturition. *Placenta*, 23(4). <https://doi.org/10.1053/plac.2001.0782>
 30. Thomson, A. J., Telfer, J. F., Young, A., Campbell, S., Stewart, C. J., Cameron, I. T., Greer, I. A., & Norman, J. E. (1999). Leukocytes infiltrate the myometrium during human parturition: further evidence that labour is an inflammatory process. *Human reproduction (Oxford, England)*, 14(1), 229–236.
 31. Keski, N, L., Aalto, M.-L., Katila, M.-L., & Kirkinen, P. (2000). Intrauterine inflammation at term: A histopathologic study. *Human Pathology*, 31(7). <https://doi.org/10.1053/hupa.2000.8449>
 32. Young, A., Thomson, A. J., Ledingham, M., Jordan, F., Greer, I. A., & Norman, J. E. (2002). Immunolocalization of Proinflammatory Cytokines in Myometrium, Cervix, and Fetal Membranes During Human Parturition at Term1. *Biology of Reproduction*, 66(2). <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.2.445>
 33. Osman, I. (2003). Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. *Molecular Human Reproduction*, 9(1). <https://doi.org/10.1093/molehr/gag001>
 34. Osorio, C. M, Perdigon, P C, et al.(2015) Escherichia coli-induced temporal and differential secretion of heat-shock protein 70 and interleukin-1beta by human fetal membranes in a two-compartment culture system. *Placenta* 36:262-269
 35. HASBUN H., JORGE, & HUSBUN N., ANDREA. (2000). Infección y parto prematuro: Enlace epidemiológico y bioquímico. *Revista chilena de infectología*, 17(1), 717. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182000000100002>
 36. ROMERO, R., MAZOR, M., MUNOZ, H., GOMEZ, R., GALASSO, M., & SHERER, D. M. (1994). The Preterm Labor Syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 734(1 The Human End). <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb21771.x>
 37. Agrawal, V., & Hirsch, E. (2012). Intrauterine infection and preterm labor. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 17(1), 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2011.09.001>
 38. Naeye, Richard L., & Peters, Ellen C. (1980). CAUSES AND CONSEQUENCES OF PREMATURE RUPTURE OF FETAL MEMBRANES. *The Lancet*, 315(8161). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(80\)90674-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(80)90674-1)
 39. Silverman, R. K., & Wojtowycz, M. (1998). Risk factors in premature rupture of membranes. *Primary Care Update for OB/GYNS*, 5(4). [https://doi.org/10.1016/S1068-607X\(98\)00092-4](https://doi.org/10.1016/S1068-607X(98)00092-4)
 40. Romero, R., & Miranda, J. (2015). Sterile and microbial-associated intra-amniotic inflammation in preterm prelabor rupture of membranes. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 28(12). <https://doi.org/10.3109/14767058.2014.958463>
 41. Vadillo, O., Beltrán M, , & Zaga V. (2004). Infección intrauterina y nacimiento pretérmino. *Revista de investigación clínica*, 56(1), 93-102. Recuperado en 28 de septiembre de 2021, de

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762004000100013&lng=es&tlng=es.

42. Gonçalves, L. F., Chaiworapongsa, T., & Romero, R. (2002). Intrauterine infection and prematurity. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 8(1). <https://doi.org/10.1002/mrdd.10008>
43. Romero, R., Gomez, R., Chaiworapongsa, T., Conoscenti, G., Cheol Kim, J., & Mee Kim, Y. (2001). The role of infection in preterm labour and delivery. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 15(s2). <https://doi.org/10.1046/j.1365-3016.2001.00007.x>
44. DiGiulio, D. B., Romero, R & Kusanovic, J. P (2010). Prevalence and Diversity of Microbes in the Amniotic Fluid, the Fetal Inflammatory Response, and Pregnancy Outcome in Women with Preterm Pre-Labor Rupture of Membranes. *American Journal of Reproductive Immunology*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00830.x>
45. Elovitz, M.A, Wang Z, Chien EK. (2003).Un nuevo modelo para el parto prematuro inducido por inflamación: el papel del factor activador de plaquetas y el receptor Toll-like-4. *Soy J Pathol*. 163 : 2103–11.
46. Flores, H, H, Garcia, L G & Diaz NF. (2012) An experimental mixed bacterial infection induced differential secretion of proinflammatory cytokines (IL-1beta, TNFalpha) and proMMP-9 in human fetal membranes. *Placenta* 33:271-277
47. Vadillo, O, F., & Estrada, G, G. (2005). Role of matrix metalloproteinases in preterm labour. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 112. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2005.00579.x>
48. Patel, F. A., & Challis, J. R. G. (2001). Prostaglandins and Uterine Activity. In *The Endocrinology of Parturition*. KARGER. <https://doi.org/10.1159/000061040>
49. Triantafilou M, Triantafilou K. (2002). Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol*.23:301–304.
50. Sun S,C. Ganchi P, A. Ballard D,W. Greene W,C. (1993). NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: Evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science*.259: (5103):1912–1915.
51. Chaudhuri, R. R., & Henderson, I. R. (2012). The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2). <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.01.005>
52. Stoppe, N. de C., Silva, J. S., & Carlos, C. (2017). Worldwide Phylogenetic Group Patterns of *Escherichia coli* from Commensal Human and Wastewater Treatment Plant Isolates. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02512>
53. Tenailon, O., Skurnik, D., & Picard, B. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>
54. Obata, Y, M., Ba, W., & Tsukamoto, T. (2002). Vaginal *Escherichia coli* share common virulence factor profiles, serotypes and phylogeny with other extraintestinal *E. coli*. *Microbiology*, 148(9). <https://doi.org/10.1099/00221287-148-9-2745>
55. Janicka, G., Wojciechowska, D., Hareńska, K., Porada, J., & Klyszejko, C. (1997). The resistance to betalactam antibiotics of lactose-positive and lactose-negative strains of *Escherichia coli*. *Acta microbiologica Polonica*, 46(4), 399–403.

56. Kaczmarek A, Skowron K & Budzynska A. (2017) Virulence genes and antimicrobial susceptibility of lactose-negative and lactose-positive strains of *Escherichia coli* isolated from pregnant women and neonates. *Folia Microbiologica* 62(5):363-371
57. Jackowiak, P., Nowacka, M., Strozycki, P. M., & Figlerowicz, M. (2011). RNA degradome--its biogenesis and functions. *Nucleic Acids Research*, 39(17). <https://doi.org/10.1093/nar/gkr450>
58. Palazzo, A. F., & Lee, E. S. (2015). Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Frontiers in Genetics*, 6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00002>
59. Montenegro R, Estrada N, Maulini L, Murialdo R. *Biología evolutiva*. 2004. 60-63 pp.
60. Szymanski M, Barciszewski J. ARN reguladores en mamíferos. *Handb. Exp. Pharmacol* 2006; 173 : 45-72.
61. Rymarquis LA, Kastenmayer JP, Huttenhofer AG, Green PJ. Diamantes en bruto: ARN no codificantes de tipo ARNm. *Tendencias Plant Sci*. 2008; 13 : 329–334
62. Pabón, M. (2011). MicroARNs: una visión molecular. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 43(3), 289-297.
63. Flores F, Martinez M, Arenas C. et al. (2007). ¡Silenciosos mensajeros! Que son y como actúan los microRNAs. *REB* 26(4): 135-141.
64. Lee, Y., Kim, M., & Han, J. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23(20). <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
65. Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
66. Hammond, S. M. (2015). An overview of microRNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 87. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.001>
67. Reinhart, B. J., Slack, F. J., & Basson, M. (2000). The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772). <https://doi.org/10.1038/35002607>
68. Lagos, Q M. (2001). Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science*, 294(5543). <https://doi.org/10.1126/science.1064921>
69. Wang, Y., Medvid, R., & Melton, C. (2007). DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nature Genetics*, 39(3). <https://doi.org/10.1038/ng1969>
70. O'Brien, J., Hayder, H., & Zayed, Y. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
71. Esquela-Kerschner, A., & Slack, F. J. (2006). Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(4). <https://doi.org/10.1038/nrc1840>
72. Zhou, W., Yuan, T., & Gao, Y. (2017). IL-1 β -induces NF- κ B and upregulates microRNA-372 to inhibit spinal cord injury recovery. *Journal of Neurophysiology*, 117(6). <https://doi.org/10.1152/jn.00936.2016>
73. Ren, K., & Torres, R. (2009). Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain research reviews*, 60(1), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.020>

74. Huang, X., Huang, M., & Kong, L. (2015). miR-372 suppresses tumour proliferation and invasion by targeting IGF2BP1 in renal cell carcinoma. *Cell Proliferation*, 48(5). <https://doi.org/10.1111/cpr.12207>
75. Voorhoeve, P. M., le Sage, C., & Schrier, M. (2006). A Genetic Screen Implicates miRNA-372 and miRNA-373 As Oncogenes in Testicular Germ Cell Tumors. *Cell*, 124(6). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.037>
76. Tian, R.-Q., Wang, X.-H., & Hou, L.-J. (2011). MicroRNA-372 Is Down-regulated and Targets Cyclin-dependent Kinase 2 (CDK2) and Cyclin A1 in Human Cervical Cancer, Which May Contribute to Tumorigenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 286(29). <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.221564>
77. Kumarswamy, R., Volkmann, I., & Thum, T. (2011). Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biology*, 8(5). <https://doi.org/10.4161/rna.8.5.16154>
78. Sheedy, F. J., Palsson-McDermott, E., & Hennessy, E. J. (2010). Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nature Immunology*, 11(2). <https://doi.org/10.1038/ni.1828>
79. Lu, T. X., Munitz, A., & Rothenberg, M. E. (2009). MicroRNA-21 Is Up-Regulated in Allergic Airway Inflammation and Regulates IL-12p35 Expression. *The Journal of Immunology*, 182(8). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803560>
80. Ning, S. L., Zhu, H., & Shao, J., (2019). MiR-21 inhibitor improves locomotor function recovery by inhibiting IL-6R/JAK-STAT pathway-mediated inflammation after spinal cord injury in model of rat. *European review for medical and pharmacological sciences*, 23(2), 433–440. https://doi.org/10.26355/eurrev_201901_16852
81. López-Bojorquez, Lucia Nikolaia. (2004). La regulación del factor de transcripción NF-κB. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio. *Revista de investigación clínica*, 56(1), 83-92. Recuperado en 28 de septiembre de 2021, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762004000100012&lng=es&tlng=es.
82. García-Rodríguez, Alba Miriam, Sánchez-González, Carolina Magali, Osorio-Caballero, Mauricio, Díaz, Néstor Fabián, & Flores-Herrera, Héctor. (2018). Expresión de microRNAs asociados con corioamnionitis en suero materno. *Ginecología y obstetricia de México*, 86(3), 174-185. <https://doi.org/10.24245/gom.v86i3.1809>

ANEXO I

Carta de autorización emitida por los Comités de Investigación.



INSTITUTO NACIONAL
DE PERINATOLOGÍA
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES

DIRECCIÓN GENERAL

INPER-DG - 000906 -2017

"AÑO DEL CENTENARIO DE LA PROMULGACIÓN DE LA CONSTITUCIÓN
POLÍTICA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS"

CIUDAD DE MÉXICO, A 29 DE SEPTIEMBRE DE 2017.

M. EN C. HÉCTOR FLORES HERRERA
INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS
ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE INMUNOBIOQUÍMICA
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
P R E S E N T E

Me es grato informar a usted y a su grupo de colaboradores que los Comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad, han revisado y emitido el dictamen de **APROBADO**, correspondiente a su proyecto:

La progesterona modula la secreción de las proteínas de choque térmico en el tejido de la coriodesciva después de la estimulación con *Escherichia coli* en un modelo de infección.

Registro: 2017-2-82

Vigencia autorizada: **18/09/2017 al 08/09/2019**

Monto autorizado: **\$ 351,300.00**

En cuanto al monto económico solicitado por usted para desarrollar el proyecto mencionado, la asignación dependerá estrictamente de la disponibilidad de los recursos fiscales correspondientes y, en su caso, de la disponibilidad de los mismos entregados por agencias financiadoras externas. Si requiere una extensión de tiempo para la terminación del proyecto deberá requisitar el formato correspondiente, y solicitarla un mes antes de la fecha de vencimiento de la vigencia del mismo.

Me permito hacer de su conocimiento que, durante el desarrollo de este proyecto, deberá entregar informes trimestrales y al concluir el mismo el **informe técnico final y financiero** según el formato institucional, para la presentación de productos de investigación, acompañado de los documentos probatorios del mismo.

Le felicito por su desempeño y compromiso institucional y me es grato enviarle un atento saludo.

ATENTAMENTE


DR. JORGE ARTURO CARDONA PÉREZ
DIRECTOR GENERAL

Montes Urales 800, Col. Lomas Virreyes, Deleg. Miguel Hidalgo, Ciudad de México, C.P. 11000
Teléfonos: 5520 8565 y 5202 2493 Fax: 5520 1593, e-mail: dirgral@inper.mx

ANEXO 2

Carta de consentimiento informado.



INSTITUTO
NACIONAL DE
PERINATOLOGÍA
Isidro Espinosa de los Reyes

DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN SOLICITUD DE EVALUACIÓN Y REGISTRO DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimada señora:

Queremos informarle que en el departamento de Inmunobiología de este Instituto se está llevando a cabo el estudio denominado

La progesterona modula la secreción de las proteínas de choque térmico en el tejido de la coriodecidua después de la estimulación con *Escherichia coli* en un modelo de infección.

Las infecciones durante el embarazo son una de las condicionantes relacionadas con los nacimientos prematuros. Se sabe que en el proceso infeccioso se da la secreción inicial de las proteínas de choque térmico las cuales están involucradas con la respuesta inmunológica. La progesterona además de mantener el embarazo modula la secreción de diferentes proteínas; sin embargo, no se ha demostrado si la progesterona disminuye la secreción de las proteínas de choque térmico, por lo que el principal objetivo en este estudio es determinar si la progesterona reduce la secreción de las proteínas de choque térmico de -60 y -70 KDa y aumenta a la Hsp-27 KDa modulando a las citocinas pro y anti-inflamatorias en el tejido de la coriodecidua humana después de la infección con *Escherichia coli*.

El estudio básicamente consiste en lo siguiente:

1. Al momento del nacimiento de su bebe y después de que sea cortado el cordón umbilical se tomarán las membranas fetales por el personal médico adscritos a este Instituto. Las membranas fetales serán utilizadas en el laboratorio.
2. Este procedimiento no representa ningún riesgo para su bebe ni para usted.
3. En el laboratorio de Investigación se procederá a evaluar la respuesta de las membranas fetales en un proceso de infección.

Su participación en este estudio permitirá contribuir en forma importante a la comprensión de la participación de la progesterona ante un estímulo infeccioso en el tejido de la coriodecidua en las fases tempranas de infección.

Nos permitimos invitarle a usted a participar en este estudio, aclarándole que en caso de que no acepta participar, **no tendrá ninguna repercusión** en la atención de usted o de su hijo(a) en el Instituto, ni en el costo de la atención médica que ambos reciban.

La información que se obtenga del estudio será estrictamente confidencial y será utilizada sólo para fines de investigación.

Las preguntas que considere necesarias para aclarar todas sus dudas las puede externar con

M. en C. Héctor Flores Herrera
Investigador en Ciencias Médicas
Instituto Nacional de Perinatología
55 20 99 00 ext 375
floresh8@yahoo.com

Dr. Alejandro Martínez Juárez
Presidente del Comité de Ética en Investigación.
Instituto Nacional de Perinatología
Tel 5520 9900 Extensión 316



TEXTO DECLARATORIO

YO _____

(Nombre del participante o de su representante legal)

Declaro libremente que estoy de acuerdo en participar (en que participe mi representado cuyo nombre aparece abajo) en esta investigación cuyo objetivo, procedimientos, beneficios, y riesgos se especifican en el Apartado A de este documento.

Se me ha informado que el participar en este estudio no repercutirá en el costo de la atención médica que se me deba brindar y que toda la información que se otorgue sobre mi (su) identidad y participación será confidencial, excepto cuando yo lo autorice.

Para los fines que se estime conveniente, firmo la presente junto al investigador que me informó y dos testigos, conservando una copia de a) Consentimiento informado y b) Información proporcionada para obtener mi autorización.

México D.F. a ____ de _____ del ____.

	NOMBRE	FIRMA
PARTICIPANTE		
REPRESENTANTE		
INVESTIGADOR	Héctor Flores Herrera	
	RELACIÓN CON LA PACIENTE	DOMICILIO
TESTIGO 1		
TESTIGO 2		